

Fábio José dos Santos Aguiar

Efeito Sinérgico do Ácido Úsnico e Agentes Antimicrobianos
Frente a *Staphylococcus aureus* Multirresistentes

Recife, 2014

Fábio José dos Santos Aguiar

Efeito Sinérgico do Ácido Úsnico e Agentes Antimicrobianos
Frente a *Staphylococcus aureus* Multirresistentes

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Patologia do Centro de Ciências da
Saúde da Universidade Federal de
Pernambuco, para obtenção do
título de Mestre em Patologia

Orientadora:

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

Co-orientador:

Prof^º Dr. José Maurício dos Santos Filho

Recife,

2014

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

A282e Aguiar, Fábio José dos Santos.
Efeito sinérgico do ácido único e agentes antimicrobianos frente a *staphylococcus aureus* multirresistentes / Fábio José dos Santos Aguiar.
- Recife: O autor, 2014.
56 f. : il. ; tab. ; 30 cm.

Orientadora: Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,
CCS. Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2014.
Inclui referências e anexos.

1. *Staphylococcus aureus*. 2. Agentes antimicrobianos. 3. Sinergismo. I. Ximenes, Eulália Camelo Pessoa de Azevedo (Orientadora). II. Título.

615.321 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2014-107)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freire Dourado

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

Prof.^a Dr.^a Catarina de Oliveira Neves

COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Prof. Dr. Mário Ribeiro de Melo Júnior

VICE-COORDENADORA DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Prof.^a. Dr.^a Manuela Figueroa Lyra de Freitas

RECIFE

2014



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Centro de Ciências da Saúde - UFPE

Av. Prof. Moraes Rego 1235 - Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife - PE

Prédio da Pós-graduação do Centro de Ciências da Saúde (CCS) - térreo

Fone/Fax: (81) 2126.8529

<http://www.ppgpatologiaufpe.com>

**DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
PATOLOGIA.**

AUTOR: FÁBIO JOSÉ DOS SANTOS AGUIAR

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PATOLOGIA

**NOME DA DISSERTAÇÃO: "EFEITO SINÉRGICO DO ÁCIDO ÚSNICO E AGENTES
ANTIMICROBIANOS FRENTE À STAPHYLOCOCCUS AUREUS
MULTIRRESISTENTES."**

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. EULÁLIA CAMELO PESSOA DE AZEVEDO XIMENES

DATA DA DEFESA: 28 DE FEVEREIRO DE 2014.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Manuela Figueiroa Lyra de Freitas

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

Prof. Dr. Joás Lucas da Silva

Aos meus pais, Pedro e
Terezinha Aguiar (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

À minha família: Eliane Aguiar, Juliana Aguiar e Daniel Aguiar pela paciência e compreensão nos numerosos momentos de ausência.

À Profa. Dra. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes pela orientação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Nicácio Henrique da Silva que gentilmente aceitou participar desta pesquisa cedendo a molécula para estudo e possibilitando a análise fitoquímica.

Ao Prof. Dr. Joás Lucas da Silva por dispor de parte de seu exíguo tempo para avaliar esta dissertação.

À Profa. Dr.^a Manuela Figueroa Lyra de Freitas pelas palavras de incentivo sempre nas horas mais difíceis.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica dos Microrganismos: Gustavo Dimech, Amanda Mesquita, Leonardo Aquino, Renata Ramos, Klewdma Araújo e Tacilene Silva pela inestimável ajuda e solidariedade.

À secretária do Programa de Pós-graduação em Patologia, Margarete Valdevino pela atenção e dedicação para com os assuntos relacionados à defesa da dissertação.

Aos colegas do Programa de Pós-graduação em Patologia: Paulo Pessoa, Débora Carthagenes, Michelly Delgado, Vanessa Fernandes, Mariléa Guimarães, Jeane Nogueira e Cristiane Ferreira pelos momentos de aprendizado e descontração.

A Cristie Araújo pelos momentos de estudo e por seu exemplo de dedicação, esforço e persistência que muitas vezes serviu de inspiração para irmos em frente.

Ao colega de trabalho e de turma João Soares pelas sugestões sem as quais esta pesquisa não

teria sido realizada.

À minha tia Maria dos Anjos, um exemplo de que na vida nunca paramos de aprender

Ao colega Eptácio Villar pelas palavras de incentivo.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram com a elaboração deste trabalho.

*“As grandes obras são realizadas não
pela força,
mas pela perseverança.”*

Autor desconhecido

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a ação sinérgica entre o ácido úsnico extraído de *Cladonia substellata* Vainio e cinco agentes antimicrobianos (ciprofloxacino, gentamicina, oxacilina e penicilina) sobre dez cepas de *Staphylococcus aureus* com fenótipo de resistência previamente definido. Cinco destas cepas de *S. aureus* (ATCC 33591, AM 13, AM 18, AM 20, AM 21) apresentaram resistência a todos os agentes antimicrobianos avaliados e desta forma foram selecionadas para o estudo do sinergismo entre o ácido úsnico e os agentes antimicrobianos através do método do tabuleiro de xadrez (*checkerboard method*). Os critérios utilizados para avaliar a atividade sinérgica foram definidos pelo Índice da Concentração Inibitória Fracionada (FICI). Todas as cepas de *S. aureus* foram suscetíveis ao ácido úsnico, determinado pelo método de microdiluição. O FICI variou de 0,25 – 1,0, sugerindo uma interação sinérgica frente as cepas de *S. aureus* MRSA. A associação do ácido úsnico com o ciprofloxacino apresentou efeito sinérgico sobre todas as cepas *S. aureus* MRSA. A oxacilina apresentou sinergismo em associação com ácido úsnico sobre as cepas de *S. aureus* ATCC 33591, AM 13, AM18 e AM24 e exibiu os menores valores FICI. A associação do ácido úsnico com a gentamicina foi sinérgica sobre as cepas AM18, AM21 e AM24. A associação do ácido úsnico com a penicilina apresentou-se indiferente para todas as cepas exceto para *S. aureus* AM13. Este estudo demonstrou que o ácido úsnico, quando associado à antimicrobianos fluoroquinolônicos, betalactâmicos e aminoglicosídeos pode agir sinergicamente, inibindo cepas de *S. aureus* MRSA.

Palavras-chave: Ácido Úsnico; *S. aureus* MRSA; *Cladonia substellata*; Sinergismo; *Checkerboard Method*; FIC índice

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of usnic acid extracted from *Cladonia substellata* Vainio and five antimicrobial agents (ciprofloxacin, gentamicin, penicillin and oxacillin) against ten strains of *Staphylococcus aureus* with resistance phenotype previously defined . Five strains of *S. aureus* (ATCC 33591 , AM 13 , AM 18 , AM 20 , AM 21) were resistant to all antimicrobial agents evaluated and were selected for this the study of the interaction of usnic acid and antimicrobial agents. All *S. aureus* strains were susceptible to usnic acid, as determined by the microdilution method. The interaction of usnic acid and the antimicrobials was performed by the checkerboard method (*checkerboard*). The criteria applied to evaluate the synergistic activity were defined by the Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI). The FICI ranged from 0.25 - 0.5 and suggested a synergistic interaction against strains of *S. aureus* MRSA. The association of usnic acid with ciprofloxacin showed synergistic effect on all strains *S. aureus* MRSA. The oxacillin showed synergism in combination with usnic acid on strains of *S. aureus* ATCC 33591, AM 13, AM18 and AM24 and exhibited the lowest values of FICI. The association of usnic acid with gentamicin was synergic on AM18, AM21 and AM24 strains. The association of usnic acid with penicillin showed indifference to all strains except for *S. aureus* AM13. This study presented that usnic acid, when associated with fluoroquinolones, beta-lactams and aminoglycosides acts synergistically inhibiting strains of *S. aureus* MRSA.

Keywords: Usnic Acid; *S. aureus* MRSA; *Cladonia substellata*; Synergism; Checkerboard; FIC Index

Lista de ilustrações

FIGURA 1 Estrutura dos enantiômeros (-) ácido úsnico e do (+) ácido úsnico	28
FIGURA 2 A- <i>Cladonia substellata</i>	28
B-Cristais do ácido úsnico extraído, isolado e purificado	28
FIGURA 3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do ácido úsnico e agentes antimicrobianos.....	38
FIGURA 4 Representação do método do tabuleiro de xadrez (Checkerboard method).....	39

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Origem e susceptibilidade das cepas <i>Staphylococcus aureus</i> utilizados na determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	41
TABELA 2	Atividade antimicrobiana do ácido úsnico e agentes antimicrobianos frente à <i>Staphylococcus aureus</i> multidroga resistentes	44

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
AMC	Amoxicilina/Ácido clavulânico
AMP	Ampicilina
AU	Ácido úsnico
AZI	Azitromicina
BHI	Brain Heart Infusion
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CFO	Cefoxitina
CIP	Ciprofloxacino
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
FIC	Concentração Inibitória Fracionada
GEN	Gentamicina
LFBM	Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistentes
TEI	Teicoplanina
TET	Tetraciclina
SZT	Sulfametoxazol/Trimetropin

Sumário

1. APRESENTAÇÃO.....	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	20
2.2 <i>Staphylococcus aureus</i> metilina resistente (MRSA).....	20
2.3 Fatores de Virulência	21
2.4 Doenças associadas à MRSA.....	23
2.5 Resistência de <i>Staphylococcus aureus</i> aos antimicrobianos.....	24
2.6 Líquens e Ácido Úsnico.....	27
2.7 Sinergismo entre substâncias naturais e antibióticos	31
3 OBJETIVOS	34
3.1 Geral.....	34
3.2 Específicos	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1 Coleta do Material líquênico.....	35
4.2 Preparação do extrato.....	35
4.3 Identificação e confirmação estrutural do ácido úsnico.....	35
4.3 Microrganismos	35
4.4 Preparação do inóculo	36
4.5 Agentes antimicrobianos.....	36
4.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	37
4.7 Determinação in vitro da atividade sinérgica	38
5. RESULTADOS	40
5.1 Perfil Fitoquímico.....	40

5.2 A atividade antimicrobiana do ácido úsnico e agentes antimicrobianos	40
5.3 Interação entre ácido úsnico e agentes antimicrobianos	42
6 DISCUSSÃO	45
7 CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS	49
ANEXOS	56
Anexo A- Isobologramas revelando o efeito sinérgico do ácido úsnico em associação com ciprofloxacino frente a <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA AM13,AM14, AM21, AM 24	56

1. APRESENTAÇÃO

A descoberta dos antibióticos nas primeiras décadas do século XX foi um marco na história da humanidade tendo revolucionado a medicina e desde então inúmeras vidas tem sido salvas graças a sua utilização (DAVIES; DAVIES, 2010).

Como consequência da utilização indiscriminada desta nova classe de medicamentos, um aumento da resistência através da pressão seletiva sobre os microrganismos tomou proporções epidêmicas com o aparecimento de bactérias com elevado padrão de resistência (CASELLAS, 2011).

Muitas espécies bacterianas exibem resistência a antibióticos e dentre estas se destaca o *Staphylococcus aureus*, bactéria Gram positiva que possui fatores de virulência relacionados ao estabelecimento de infecção tais como: lipases, exotoxinas, enterotoxinas, α -toxina (LI et al., 2011). Por outro lado, esta espécie vem apresentando cada vez mais resistência aos antibióticos o que levou ao surgimento de uma linhagem denominada *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), identificada inicialmente em cepas de origem hospitalar (HA-MRSA) e posteriormente em cepas de origem comunitária (CA-MRSA). Estas cepas são resistentes a quase todos antibióticos utilizados na prática clínica, exceto ceftaroline (COOMBS et al., 2011, (SARAVOLATZ; STEIN; JOHNSON, 2011).

As cepas MRSA são potentes produtoras de fatores de virulência tais como: proteína A, proteínas de adesão à fibronectina, proteases, lipases, hemolisina, leucocidina de Pantone-Valentine, e polissacarídeos capsulares e são consideradas um dos grandes desafios para saúde pública mundial (GOULD et al., 2012).

No Brasil foi identificado um clone denominado clone endêmico brasileiro de MRSA. Trata-se de uma cepa de origem hospitalar e tipicamente resistente a vários antibióticos. Os antimicrobianos clindamicina, ciprofloxacino, gentamicina e sulfametoxazol-trimetropim são efetivos em menos de 10% desses isolados (ROSSI, 2011).

Estas cepas com elevado perfil de resistência aos antimicrobianos acarretam em altos custos financeiros à sociedade sendo a causa de ausência no trabalho, despesas relacionadas às hospitalizações, sobretudo com o uso de antibióticos de última geração. Estima-se que só na Europa as despesas atribuídas a hospitalizações por MRSA tenham alcançado valores de

aproximadamente 63,1 milhões de dólares em 2007 (KRAKER et al., 2011), nos Estados Unidos da América dados de 2005 indicam valores em torno de 9 bilhões de dólares (KLEIN; SMITH; LAXMINARAYAN, 2007).

Embora no Brasil as estatísticas não sejam precisas, as infecções nosocomiais por MRSA são frequentes o que indica consequências econômicas similares ao panorama mundial. Dados do Programa de Vigilância Epidemiológica-SENTRY registram que no período de 2005 a 2008 as frequências de isolamentos de *Staphylococcus aureus* oriundas de infecção hospitalar foram de 20,2% (bacteremia), 28,1% (pele e tecidos moles) e 24,9% (pneumonia) (GALES et al., 2009).

A urgência por uma alternativa terapêutica à utilização de antibióticos fez surgir várias linhas de pesquisas como a supressão da colonização através da utilização de probióticos, a estimulação da resposta imune do hospedeiro, uso de substâncias inibidoras de fatores de virulência (PARK; LIU, 2012) e a utilização de efeito sinérgico entre diversos antibióticos com substâncias naturais (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012).

Vários são os grupos de substâncias naturais que exibem atividade antimicrobiana. Esta diversidade de moléculas é originária de relações intrínsecas entre os seres vivos e o meio ambiente através da seleção natural o que aconteceu durante bilhões de anos conferindo desta forma um mecanismo de defesa eficaz contra microrganismos (SIMÕES; BENNETT; ROSA, 2009). Alcaloides, flavonoides, isoflavonoides, terpenos, glicoesteroides, isotiocianatos, polipeptídeos, moléculas de origem microbiana, algas, líquens e muitos outros são metabolitos secundários com reconhecida atividade antimicrobiana (DAVIDSON; CRITZER; TAYLOR, 2013).

Dentre os vários organismos produtores de substâncias com atividade antimicrobiana, destacam-se os líquens (DEVARAJA, 2012).

Líquens são organismos singulares caracterizados por uma associação simbiótica entre fungos filamentosos e algas fotossintetizantes e/ou cianobactérias. Possuem uma taxa de crescimento lento e são encontrados em vários ecossistemas desde as regiões polares às regiões tropicais em condições ambientais hostis o que induz a produção de numerosas moléculas bioativas tais como o ácido úsnico (SHRESTHA; ST. CLAIR, 2013).

O ácido úsnico [2,6-diacetil-7,9-dihidroxi-8,9b-dimetil-1,3(2H,9bH)-dibenzo-

furanodiona], isolado primeiramente em 1844, tem sido o mais estudado metabólito proveniente de líquens e é comercialmente disponível. Ácido úsnico é encontrado exclusivamente em líquens sendo abundante nos gêneros *Alectoria*, *Cladonia*, *Usnea*, *Lecanora*, *Ramalina* e *Evernia*. Na sua forma pura é utilizado na formulação de cremes, creme dental, desodorantes, colutórios, xampus e protetores solares. Em algumas formulações é utilizado como princípio ativo em outras como agente coadjuvante. Esta molécula apresenta atividade antimicrobiana contra patógenos humanos e fitopatógenos além de exibir propriedade antiviral, anti-inflamatória, antiprotzoária, antiproliferativa e analgésica (GUO et al., 2008; INGOLFSDOTTIR, 2002; MOLNÁR; FARKAS, 2010)

Diante do exposto o presente trabalho teve como objetivo em sua primeira etapa um estudo da atividade antimicrobiana do ácido úsnico extraído de *Cladonia substellata* e, posteriormente, a avaliação da sua interação com agentes antimicrobianos frente a amostras de *Staphylococcus aureus* multidroga resistentes.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é um dos mais estudados microrganismos patogênicos tendo sido relacionado ao surgimento de abscessos por Ogston em 1880 (SHINEFIELD; NAOMILRUFF, 2009). É a bactéria patogênica mais isolada em humanos podendo ser responsável por infecções da pele e de tecidos moles, infecções vasculares, pneumonia, osteomielite, septicemia e infecções relacionadas a corpos estranhos (DAVID; DAUM, 2010). Pode ser agente etiológico de infecções localizadas de fácil tratamento à infecções graves tais como: meningite, endocardite e celulite relacionadas a altos índices de morbidade e mortalidade (MILLER; CHO, 2011).

S. aureus apresenta a morfologia de cocos Gram positivos, imóveis, não forma esporos, produz coagulase e DNase o que o distingue de outras espécies do gênero *Staphylococcus* (MANDELL; BENNETT; DOLIN, 2010). É anaeróbio facultativo, capaz de gerar energia através de respiração aeróbica e fermentação. Produz catalase, característica utilizada no diagnóstico diferencial do gênero *Streptococcus* que é negativo para esta enzima. Requer nutrientes complexos como aminoácidos e vitamina B para seu crescimento e tolera concentrações de cloreto de sódio até 1,7 molar (PLATA; ROSATO; WEGRZYN, 2009).

É de conhecimento da ciência a existência de várias cepas de *Staphylococcus aureus* que apresentam variações na produção de fatores de virulência como também na resistência aos antimicrobianos sendo classificadas como cepas de origem hospitalar e comunitária (TONG; CHEN; FOWLER JUNIOR, 2012).

2.2 *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA)

A existência de resistência aos antibióticos pelo *Staphylococcus aureus* tem sido reportada desde a década 1940 com a identificação de cepas resistentes à penicilina.

Posteriormente, à introdução da meticilina na clínica médica foram identificadas cepas resistentes a este antibiótico e denominadas *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA) que possuem o cassete cromossômico mec I responsável pela resistência. A esta segunda onda de resistência seguiu-se outra com a identificação em meados da década de 1970, de cepas possuidoras de cassetes mec II e mec III constituindo o seu isolamento no ambiente hospitalar a pandemia observada nos dias atuais nos hospitais e serviços de saúde. Por outro lado, o uso de vancomicina para o tratamento de MRSA fez surgir cepas de resistência intermediária à vancomicina (VISA). Entretanto em meados da década de 1990 surgiram os primeiros casos de MRSA não associados ao ambiente hospitalar e sim à comunidade denominados CA-MRSA que possuem o cassete mec IV. Por último em 2002 foram identificados os primeiros casos de *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina sendo denominados (VRSA) (CHAMBERS; DELEO, 2009).

2.3 Fatores de Virulência

Esta espécie bacteriana possui um verdadeiro arsenal de mecanismos responsáveis por sua patogenicidade que permite a evasão do sistema imune do hospedeiro como também o estabelecimento dos processos mórbidos. Tais mecanismos são conhecidos por fatores de virulência. Estes fatores compreendem polissacarídeos capsulares, proteínas de superfície, exotoxinas e endotoxinas (TONG; CHEN; FOWLER JUNIOR, 2012).

Polissacarídeos capsulares são exopolissacarídeos que podem impedir a fagocitose por células polimorfonucleares e ainda promover a adesão às células do hospedeiro e a dispositivos de próteses (WINN JUNIOR et al., 2008).

Proteínas de superfície tais como: coagulase que se liga a protrombina convertendo o fibrinogênio em fibrina (MCADOW; MISSIAKAS; SCHNEEWIND, 2012), proteína A presente praticamente em todas as cepas de *Staphylococcus aureus* que se liga a região Fc da imunoglobulina G (IgG) inibindo a opsonização (CLARO et al., 2011), adesinas envolvidas

na aderência à vários fatores do hospedeiro (HIRSCHHAUSEN et al., 2012), fator de agregação A (*clumping factor A*) que se liga ao fibrinogênio e confere propriedades anti-fagocitárias em relação aos leucócitos polimornucleares e macrófagos (CHENG et al., 2011), fator de agregação B (*clumping factor B*) associado a infecções respiratórias pois promove a adesão do *S. aureus* à citoqueratinas presentes no epitélio nasal (PARKER; PRINCE, 2012).

Em adição a estes fatores *S. aureus* produz uma série de proteínas e enzimas como proteases, lipases, elastases e toxinas que favorecem a invasão e dificultam a ação da resposta imune do hospedeiro (GORDON; LOWY, 2008).

A alfa hemolisina é uma proteína que forma poros na membrana celular permitindo o fluxo de íons, como o cálcio, induzindo a ativação da piroptose e inflamossoma via caspase 1, a toxina beta capaz de levar a lise de hemácias, monócitos, linfócitos e neutrófilos, a toxina 1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1) considerada um super antígeno, a toxina esfoliativa também conhecida por toxina da síndrome da pele escaldada induz eritema e esfoliação da pele, as enterotoxinas que produzem intoxicação alimentar, leucocidinas como a leucocidina de Panton-Valentine que causa apoptose dos neutrófilos via caspases 3 e 9 cujo papel nas pneumonias necrosantes ainda está sob investigação (MORELL; BALKIN, 2010; PARKER ; PRINCE, 2012).

Outro fator de virulência importante é a capacidade de produzir biofilme. De acordo com Dolan e Costerton (2002), biofilme é uma comunidade imóvel de origem microbiana caracterizada por células que estão aderidas irreversivelmente a um substrato, superfície ou entre si, inseridas em uma matriz de polímeros extracelulares produzida por elas mesmas e que apresentam um fenótipo alterado em relação à taxa de crescimento bem como à transcrição de genes. Segundo estes mesmos autores a natureza estrutural e as características dos microrganismos formadores do biofilme conferem a este uma inerente resistência a agentes anticromicrobianos quer sejam antibióticos, desinfetantes ou germicidas.

S. aureus pode produzir biofilmes e uma vez estabelecidos são resistentes ao tratamento antimicrobiano e à resposta imunológica do hospedeiro sendo portanto responsáveis por infecções recorrentes (ARCHER et al., 2011)

2.4 Doenças associadas à MRSA

As apresentações clínicas do MRSA dependem do sítio anatômico onde está localizada a infecção como também dos fatores de virulência produzidos pela cepa que está causando a infecção. *S. aureus* pode levar a infecções da pele que variam desde infecções simples de serem tratadas à infecções complicadas que podem levar à hospitalizações. Dentro destes grupos de doenças são relatados casos de impetigo, foliculite/furunculose, abscessos, polimiosite e fascite necrosante. Estas infecções podem ter efeitos localizados ou mesmo efeitos sistêmicos devido a possibilidade de que cepas produtoras de toxinas estejam envolvidas como observado na síndrome da pele escaldada estafilocócica e no impetigo bolhoso (TANG; STRATTON, 2010).

Por outro lado, certas cepas podem produzir enterotoxinas que podem resultar em quadros de intoxicação alimentar. Neste casos o efeito dá-se não pela presença da bactéria em si mas pela ingestão de enterotoxinas produzidas por este microrganismo em alimentos contaminados. Estas toxinas são termoestáveis não tendo, portanto, sua atividade alterada pelo cozimento. Esta intoxicação possui um rápido período de incubação e não está associada à febre mas a náuseas e vômitos seguidos de dor abdominal e diarreia tendo uma duração entre 6 a 12 horas (BALABAN ; RASOOLY, 2000)

A infecção de regiões mais profundas da derme ou de tecidos moles, pode levar a um quadro mais severo com implicações sistêmicas como o observado na síndrome do choque tóxico estafilocócico causada pela resposta do hospedeiro à presença da TSST-1(Toxina da Síndrome do Choque Tóxico) que desencadeia a síntese maciça de citocinas tais como o TNF α (fator de necrose tumoral), IL1 (interleucina 1) e a IL6 (interleucina 6) levando à

fragilidade capilar e a um quadro clínico composto por febre alta, cefaleia, confusão, hiperemia conjuntival, *rash* cutâneo, edema subcutâneo, vômito, diarreia, hipotensão refratária, oligúria e insuficiência renal (SOSPEDRA; MAÑES; SORIANO, 2012).

A produção da Leucocidina de Panton-Valentine, por parte de CA-MRSA, está associada à pneumonia necrosante, uma doença grave. Esta toxina se liga a membrana plasmática de polimorfonucleares, monócitos e macrófagos promovendo a abertura de canais de cálcio o que leva ao influxo de cálcio, indução de mediadores da inflamação e apoptose ou necrose (CUPANE et al., 2012).

Muitas outras doenças estão associadas ao *Staphylococcus aureus*. Osteomielite (ULUĞ, AYAZ ; CELEN, 2011), trombose de seios cavernosos e meningite (MUNCKHOF et al., 2008), endocardite (SLABBEKOORN et al., 2010) e artrite séptica (WAGURI-NAGAYA et al., 2007).

2.5 Resistência de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos

Resistência é um fenômeno pelo qual agentes infecciosos tornam-se refratários às drogas utilizadas no tratamento e pode ser exibida por parasitas, fungos, vírus e bactérias (DAVIES, J.; DAVIES, D., 2010). Resistência aos antimicrobianos em bactérias patógenas foi identificada logo após a introdução dos antibióticos na prática clínica, com raras exceções (MAZEL; DAVIES, 1999). Estudos indicam entretanto que a resistência bacteriana aos antibióticos é um processo que está presente nestes microrganismos muito anterior à descoberta destas substâncias pelo homem, sendo fruto da história evolutiva das bactérias ao longo de bilhões de anos (SPELLBERG et al., 2008). Vários mecanismos podem ser responsáveis pelo surgimento de resistência aos antimicrobianos tais como: resistência intrínseca da espécie, neste caso todas as cepas apresentam resistência a um ou alguns antimicrobianos ou resistência adquirida na qual uma cepa inicialmente sensível torna-se resistente, reproduzindo-se e disseminando-se sob a pressão seletiva exercida pelo uso deste antimicrobiano (TENOVER, 2006).

Microrganismos podem adquirir genes que codificam enzimas, como betalactamases que destroem o antimicrobiano antes que este produza algum efeito (TENOVER, 2006), como por exemplo carbapenemases que conferem resistência a carbapenêmicos e outros betalactâmicos (MARSIK; NAMBIAR, 2011).

Bactérias podem adquirir genes que levam à síntese de bombas de efluxo que expulsam o antimicrobiano antes que este atinja a região alvo para produzir seu efeito como a bomba de efluxo MexXY-OprM apresentada por cepas de *Pseudomonas aeruginosa* que confere resistência aos aminoglicosídeos (FERNÁNDEZ; BREIDENSTEIN; HANCOCK, 2011).

Bactérias adquirem genes que levam a alterações metabólicas que alteram a síntese de sua parede celular reduzindo a ligação do antimicrobiano ao microrganismo, como apresentado por cepas de *Enterococcus sp* resistentes ao glicopeptídeo vancomicina (ARIAS; MURRAY, 2012).

Alterações na síntese de porinas ribossomais da região 50S por sua vez, é o mecanismo de resistência aos macrolídeos (DAVIES; DAVIES, 2010) e é apresentado por várias espécies bacterianas tais como: *Streptococcus pneumoniae* (ALTUN et al., 2014), *Mycoplasma pneumoniae* (LIU et al., 2013), *Staphylococcus aureus* (VAN DER MEEREN et al., 2014), *Campylobacter jejunii* (KOVAČ et al., 2014), *Neisseria gonorrhoeae* (LEWIS, 2013) e *Pseudomonas aeruginosa* (MARVIG et al., 2012).

Tão rápido quanto os antimicrobianos são introduzidos *Staphylococcus aureus* tem desenvolvido mecanismos para neutralizá-los (LOWY, 2003). A resistência à penicilina é mediada pelo gene *BlaZ* (LOWY, 2003) e deve-se à produção de betalactamase (penicilinase) que hidrolisa o anel betalactâmico inativando portanto este antibiótico e também a amoxicilina e ampicilina (SANTOS et al., 2007).

Alternativamente foi desenvolvida em meados de 1960 a meticilina, uma penicilina semi-sintética que não era susceptível a ação da betalactamase. Entretanto, cepas de *S. aureus*

resistentes à meticilina e também às cefalosporinas começaram a ser isoladas no início da década de 1970 (SANTOS et al., 2007). Nesta espécie, o mecanismo mais importante envolvido na resistência à meticilina é a produção de *penicillin-binding protein* (proteína ligadora de penicilina) 2a, ou 2' (PBP2a ou PBP2'), que tem baixa afinidade por betalactâmicos e catalisa a síntese de parede celular mesmo na presença de penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos. Esta proteína é codificada pelo gen *mecA* que está localizado em uma região adquirida denominada *staphylococcal cassette chromosome mec* (SCCmec), cassette cromossômico estafilocócico *mec* (MOELLERING JUNIOR, 2012). A literatura científica descreveu 12 tipos de cassetes cromossômicos *mec* (MOELLERING JUNIOR, 2012; GOULD, 2012).

Em adição a esses perfis, também são descritos na literatura resistência aos macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas do tipo B (família MSL_B), sendo a clindamicina um dos representantes deste grupo mais usados na prática médica (MERINO-DÍAZ et al., 2007; SIREESHA; SETTY, 2012). Os mecanismos pelos quais esta resistência é adquirida é caracterizada por três vias: pela síntese de uma enzima metilase codificada por uma variedade do gene *erm* que pode ser constitutiva (cMLS_B) ou induzida (iMLS_B), pela ação de uma bomba de efluxo localizada na região citoplasmática da membrana celular bacteriana codificada pelo gene *msr A* e por inativação de lincosaminas pela ação do gene *inu A* (SIREESHA; SETTY, 2012).

A vancomicina , um glicopeptídeo, liberada quase conjuntamente pelo FDA em 1958 com a meticilina e cefalotina, estas com toxicidade bem menor, teve sua utilização reservada por muitos anos devido ao sucesso da meticilina, tornou-se porém a opção de escolha para os tratamentos de MRSA. Entretanto em 1997 no Japão foi isolada a primeira cepa de *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina (HIRAMATSU et al., 1997). Os mecanismos propostos para tal resistência é a existência de uma parede celular mais espessa com mais camadas de peptidoglicano o que dificulta ou mesmo impede a ação da vancomicina na membrana citoplasmática (COSGROVE; CARROLL; PERL, 2004) e a presença do gene *van*

A que embora seja originalmente encontrado em *Enterococcus faecalis* foi demonstrado sua transferência a cepas de *S. aureus in vitro* (NOBLE; VIRANI; CREE, 1992) como também foi encontrado em cepas oriundas de caso clínico isolado em Michigan nos Estados Unidos da América (CHANG et al., 2003).

2.6 Líquens e Ácido Úsnico

Líquen é uma associação simbiótica entre fungos filamentosos e uma alga ou cianobactéria que são os elementos fotossintetizantes do conjunto e em alguns casos associações destes fungos com bactérias não fotossintetizantes (SELBMANN et al., 2009; SHRESTHA; ST. CLAIR, 2013). Estas associações permitem que os organismos simbiontes possuam numerosos mecanismos de resistência tais como: proteção contra um amplo espectro de microrganismos, animais predadores e competidores vegetais; defesa contra estresse ambiental como radiações ultravioleta e dessecação; regulação fisiológica do metabolismo, como a habilidade de aumentar a permeabilidade da membrana celular da alga que confere a capacidade de aumentar o fluxo de nutrientes ao elemento fúngico (MOLNÁR; FARKAS, 2010; SHRESTHA; ST. CLAIR, 2013).

Essas características são traduzidas pelo fato dos líquens serem considerados uma das primeiras formas de vida a surgir no planeta Terra sendo um dos primeiros seres vivos a habitar novos ecossistemas, tendo sido encontrados evidências de sua existência em fósseis datados em 600 milhões de anos (YUAN; XIAO; TAYLOR, 2005). Por outro lado, devido à sua adaptabilidade e diversidade estima-se a existência de aproximadamente 18500 espécies de líquens nos mais diversos ambientes do planeta, mesmo nos mais inóspitos como no continente antártico (FEUERER; HAWKSWORTH, 2007).

Líquens podem produzir substâncias ligadas ao metabolismo primário tais como: aminoácidos, polióis, carotenóides, polissacarídeos e vitaminas que tem função estrutural ou ligada a fisiologia liquênica bem como moléculas do metabolismo secundário que são produzidas em resposta às condições impostas pelo meio ambiente e compoem-se na maioria

de substâncias de baixo peso molecular principalmente ácidos como ácido girofórico, salicílico, lecanórico, crustínico, lobárico, umbilicárico, ovoico, úsnico entre outros (PODTEROB, 2008).

Ácido Úsnico é produzido em *Cladonia* (família Cladoniaceae), *Usnea* (Usneaceae), *Lecanora* (Lecanoraceae), *Ramalina* (Ramalinaceae), *Evernia* e *Parmelia* (Parmeliaceae), *Alectoria* (Alectoriaceae) e em outros gêneros de líquens é, talvez, o metabólito secundário mais conhecido de líquens (INGOLFSDOTTIR, 2002). É um composto cristalino de cor amarela, um derivado do dibenzofurano, existindo como dois enantiômeros, diferindo na posição angular do grupo metil no C (9b) (SOKOLOV; LUZINA; SALAKHUTDINOV, 2012).

Figura 1 – Estrutura dos enantiômeros (-) ácido úsnico e do (+) ácid

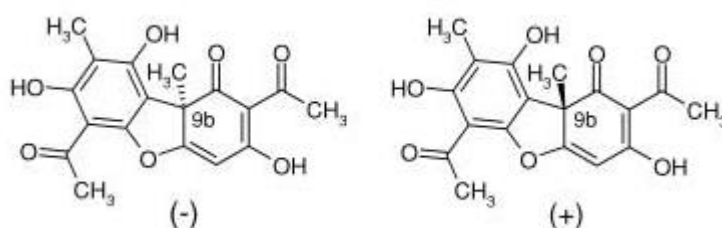
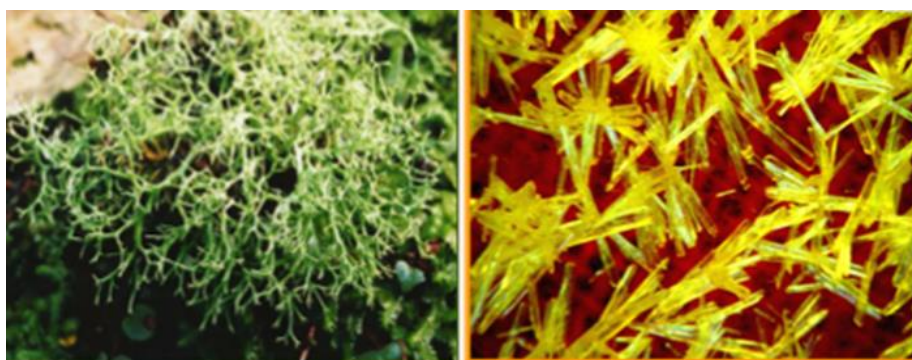


Figura 2 – A- *Cladonia substellata* B- Cristais do ácido úsnico extraído, isolado e purificado de *C.substellata* no Laboratório de Química de Produtos Naturais do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE . Foto: Márcio Lima



Vários estudos têm demonstrado as possibilidades terapêuticas do uso do ácido úsnico como molécula com atividade anti-inflamatória, antioxidante, antiproliferativa, antiparasitária, antiviral e antimicrobiana (GUPTA et al., 2012; INGOLFSDOTTIR, 2002; ZAMBARE; CHRISTOPHER, 2012)

Avaliando o efeito na produção de fator de necrose tumoral (TNF α) e óxido nítrico pelo ácido úsnico em macrófagos, Jin et al. (2008) encontraram que o ácido úsnico reduziu a produção de TNF α como também inibiu a produção de óxido nítrico através da inibição da expressão de RNAm de TNF α como também a supressão da translocação nuclear de NF- κ B p65 indicando forte atividade anti-inflamatória.

Ação antioxidante foi demonstrada em linfócitos humanos mantidos em cultura e submetidos à exposição à várias concentrações de ácido úsnico. Baixas concentrações (1 a 5 g/mL) de ácido úsnico aumentaram os níveis de capacidade antioxidante total e os níveis de *status* oxidativo total não foram alterados em todas as concentrações, exceto em 200 g/mL (POLAT et al., 2013).

Ácido úsnico mostrou efeitos inibitórios sobre o crescimento e proliferação celular em linhagens de células de câncer humano: células de câncer de mama (T-47D) e de câncer de pâncreas (Capan-2) (EINARSDÓTTIR et al., 2010), de melanoma (FemX) e de carcinoma de cólon (LS174) (RANKOVIĆ et al., 2012), em linhagens de células de câncer do pulmão e linfócitos (KOPARAL; TÜYLÜ; TÜRK, 2006; SINGH et al., 2013)

Atividade antiparasitária foi demonstrada utilizando-se ácido úsnico isolado de *Cladonia substellata*, contra *Trypanosoma cruzi*, *in vitro*. A incubação de culturas de células na forma epimastigota com 5–30 mg/ml deste composto resultou em inibição do crescimento de forma dose dependente. A análise estrutural mostrou danos à mitocôndria e aumento do volume do cinetoplasto e vacuolização da matriz mitocondrial e intensa lise das formas tripomastigotas também foi observado (DE CARVALHO et al., 2005). Atividade antiplasmodial foi observada em amostras de *Plasmodium berghei* através da técnica de

imunofluorescência tendo sido verificado que o ácido úsnico foi fortemente ativo nas formas do estágio hepático do parasita mas não no estágio sanguíneo (LAUINGER et al., 2013).

Ação antiviral do ácido úsnico e derivados foi verificada em relação ao vírus influenza A(H1N1)2009 Sokolov et al (2012). Neste trabalho os autores observaram que o isômero (-) do ácido úsnico foi mais ativo que a forma (+) e considerando que esta molécula é supressora de NF- κ B p65, os autores sugerem que a ação antiviral do ácido úsnico esteja relacionada a esta propriedade uma vez que NF- κ B p65 é uma molécula importante no ciclo vital do vírus influenza.

Ácido úsnico obtido de *Parmelia caperata* mostrou forte efeito antimicrobiano contra seis cepas de bactérias: *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e dez cepas de fungos patógenos humanos, animais, fitopatógenos, produtores de micotoxinas e deteriorantes de alimentos: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Botrytis cinerea*, *Candida albicans*, *Fusarium oxysporum*, *Mucor mucedo*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium purpurescens*, *Penicillium verrucosum* e *Trichoderma harzianum* (RANKOVIĆ; MIŠIĆ; SUKDOLAK, 2007).

Analizando a ação antimicrobiana de extrato de plantas e líquens, Weckesser et al.,(2007) obtiveram resultados indicando uma maior sensibilidade ao ácido úsnico por *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* meticilina resistente, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Corynebacterium amycolatu* e *Corynebacterium pseudodiphthericum* com concentração inibitória mínima variando entre 4 e 16 μ g/mL. Estudando a atividade antimicrobiana de ácido úsnico, atranorina e ácido fumarprotocetrárico frente a cepas de *Staphylococcus aureus* meticilina sensíveis e meticilina resistentes isolados de pacientes com fibrose cística Pompilio et al.(2013), encontraram que o ácido úsnico apresentou forte atividade antimicrobiana tanto nas bactérias em sua forma planctônica quanto na forma de biofilme.

Por sua vez, em pesquisa sobre a atividade *in vitro* de extratos e seus constituintes químicos obtidos de *Ramalina roesleri* Nyl frente à cepas de *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus viridochromogenes* e *Staphylococcus aureus*, Sisodia et al. (2013) observaram um percentual de inibição pelo ácido úsnico da ordem de 95%, 92%, 90% e 75%, respectivamente.

Vários trabalhos tem demonstrado atividade antimicrobiana de ácido úsnico contra bactérias Gram positivas, principalmente do gênero *Staphylococcus* destacando que a otimização de sua obtenção e solubilização são fatores importantes para o incremento desta atividade (FRANCOLINI et al., 2013; GRUMEZESCU et al., 2013; IVANOVIC et al., 2013; SRIVASTAVA et al., 2013).

2.7 Sinergismo entre substâncias naturais e antibióticos

Do ponto de vista da interação entre substâncias medicamentosas pode haver indiferença, antagonismo ou sinergismo. Indiferença farmacológica ocorre quando da associação de dois medicamentos, o mecanismo de ação de um não interfere no mecanismo de ação do outro, os dois medicamentos não interagem sob nenhum aspecto de sua ação farmacodinâmica ou farmacocinética (OLIVEIRA, 1986). No antagonismo a resposta farmacológica de um medicamento é suprimida ou reduzida na presença de outro através de mecanismos químicos, farmacocinéticos, competição ou mesmo bloqueio de um mesmo receptor (OLIVEIRA, 1986). No sinergismo existe a associação de dois ou mais medicamentos, cuja resultante é maior do que a simples soma dos efeitos isolados de cada um deles, o que pode levar a aumento da eficácia, redução da toxicidade, diminuição dos efeitos adversos, menor dose terapêutica e redução do avanço da resistência bacteriana aos antimicrobianos (VAN VUUREN; VILJOEN, 2011).

Vários estudos têm demonstrado o efeito sinérgico entre substâncias naturais e antibióticos. De acordo com Hemaiswarya, Kumar e Doble, (2008), muitos extratos de plantas

podem exibir atividade sinérgica com antimicrobianos no combate à infecções por bactérias, fungos e micobactérias.

Chan et al (2011) utilizando o método do tabuleiro de xadrez, demonstraram que a baicaleína um flavonoide presente em *Scutellaria baicalensis* Georgi, pode reverter significativamente a resistência à ciprofloxacina por *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA) possivelmente pela inibição da bomba de efluxo NorA *in vitro*.

Estudando a atividade sinérgica entre triterpenoides pentacíclicos e os antibióticos metilina e vancomicina contra MRSA, Chung et. al.(2011) encontraram que apesar de ter uma fraca atividade isoladamente, estes terpenos exibiram atividade sinérgica com os antibióticos. Utilizando o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (TeaTree) e a tobramicina frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, Arrigo et. al. (2010) também observaram efeito sinérgico.

O efeito sinérgico pode ser verificado entre substâncias naturais com combinações de extratos de *Alpinia galanga*, *Rosmarinus officinalis* e *Eucalyptus staigerana* frente à *S.aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Clostridium perfringens*, tendo encontrado forte atividade antimicrobiana com as associações exceto em relação ao *Clostridium perfringens*, Weerakkody et al.(2011)

Mitchell et al (2012) em estudo de sinergismo *in vitro* com tomatidina , alcaloide presente no tomate e antimicrobianos demonstraram que houve efeito sinérgico entre a tomatidina e aminoglicosídeos mas não encontraram o mesmo efeito em outras classes de antimicrobianos frente à MRSA.

Bakar, Zin e Basri (2012) estudando a ação sinérgica entre seis flavonoides e os antimicrobianos vancomicina e oxacilina frente a cepas de *Staphylococcus aureus* vancomina intermediários (VISA) encontraram atividade sinérgica entre a flavona e ambos os antimicrobianos representados por índice da fração inibitória fracionada (FIC) de 0,094 e 0,126 respectivamente.

Avaliando o efeito sinérgico entre o extrato aquoso de *Psidium guineense* Swartz (Araçá-do-campo) e antibióticos, Fernandes et al.(2012) observaram que a associação entre o extrato e os antibióticos exibiu uma concentração inibitória mínima (CIM) oito vezes menor do que as substâncias isoladas e FICI entre 0,125 a 0,5.

Sinergismo entre ácido úsnico e antibióticos frente a cepas de *Staphylococcus aureus* foi observado por Segatore et al (2012) tendo o ácido úsnico exibido efeito sinérgico com clindamicina, gentamicina e oxacilina quando analisados pelo método do índice da concentração inibitória fracionada.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a ação sinérgica entre o ácido úsnico e cinco agentes antimicrobianos frente a cepas de *Staphylococcus aureus* metilina resistentes (MRSA) .

3.2 Específicos

Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) do ácido úsnico e dos antimicrobianos, ciprofloxacina, oxacilina, gentamicina e penicilina frente a dez cepas de *S. aureus* metilina resistentes;

Avaliar o tipo de interação entre o ácido úsnico e antimicrobianos frente a cinco cepas de MRSA pelo método do tabuleiro de xadrez.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta do Material liquênico

Cladonia substellata Vainio foram coletadas por Bruno Rafael Rodrigues Monteiro em 12 de setembro de 2013 na cidade de Mamanguape, estado da Paraíba (06° 42' 42,4" S 35° 07' 0" O) e identificadas pela bióloga Maria de Lourdes Lacerda Buril. Uma exsicata foi depositada no herbário prof. Geraldo Mariz, Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pernambuco e registrado sob o número 75705.

4.2 Preparação do extrato

O talo de *C. substellata*, 12,76g foi triturado e submetido à extração por esgotamento a frio com éter etílico P.A. (Sigma Aldrich). O extrato obtido foi em seguida concentrado até a secura em rotaevaporador acoplado a banho-maria a 40 °C. O extrato etéreo de *C. substellata* foi purificado em coluna de sílica gel (Merck, de porosidade 70-230 mesh). Eluída com o sistema de solvente composto por clorofórmio: n-hexano (80:20 v/v) conforme a metodologia descrita por Odabasoglu et al. (2006).

4.3 Identificação e confirmação estrutural do ácido úsnico

A identificação do ácido úsnico e sua confirmação estrutural foi realizada através da análise por espectrometria de infravermelho em espectrômetro modelo IF566 usando discos de KBr marca Bruker Fourier, ressonância magnética nuclear marca Varian Unity Plus 300

4.3 Microrganismos

Neste trabalho foram utilizadas cepas de *Staphylococcus aureus* (n=10) isoladas de amostras clínicas, bem como duas cepas padrão obtida do “American Type Culture Collection”, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e ATCC 33591.

O fenótipo de resistência destas cepas foi obtido através do método de difusão em

meio sólido para diversos agentes antimicrobianos, betalactâmicos, fluoroquinolônicos, e aminoglicosídeos, tetraciclina e sulfa. Estas cepas foram mantidas a -80°C em caldo Brain Heart Infusion – BHI (Acumedia Manufacturers[®], USA), contendo 20% v/v glicerol. A reativação destas culturas foi realizada a cada experimento.

4.4 Preparação do inóculo

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

4.5 Agentes antimicrobianos

Os agentes antimicrobianos foram adquiridos juntos as seguintes empresas: Laboratório Teuto brasileiro S/A - penicilina, Novafarma Indústria Farmacêutica - oxacilina Hipolabor Farmacêutica LTDA - gentamicina, Eurofarma Laboratório do Brasil LTDA – ciprofloxacino.

Ciprofloxacino (CIP), gentamicina (GEN), oxacilina(OXA) e penicilina G (PEN) tiveram potência determinada através de compêndio oficial (United States of America Pharmacopea). A resistência a estes antimicrobianos das cepas de *Staphylococcus aureus* utilizadas neste estudo foi definida para cada caso : ciprofloxacino (CIP, CIM $\geq 4\mu\text{g/mL}$); gentamicina (GEN, CIM $8\mu\text{g/mL}$); oxacilina (OXA, CIM $4\mu\text{g/mL}$) e penicilina G (PEN, CIM $0,25\mu\text{g/mL}$) de acordo com os critérios estabelecidos pelo *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI,2012).

4.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

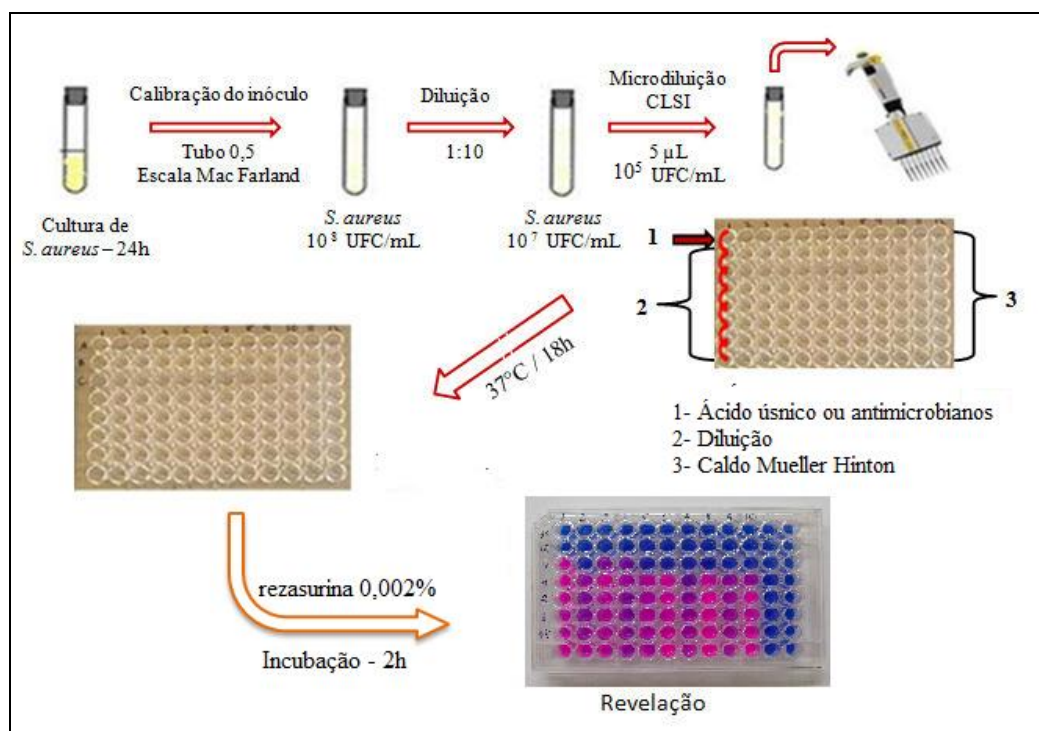
Para determinação da CIM foi utilizado o método de microdiluição, modificado (CLSI, 2010). Este ensaio foi realizado em placas de microdiluição, com 96 poços de fundo em forma de “U”.

O ácido úsnico e os agentes antimicrobianos foram pesados analiticamente e depois solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) e água destilada esterilizada de forma a obter uma solução de 1280 µg/mL para o ácido úsnico e 2048 µg/mL para os agentes antimicrobianos. Destas soluções, 200 µL foram pipetados nos orifícios de 1 a 12 da linha A. Os demais poços foram preenchidos com 100 µL de caldo Mueller Hinton. Uma alíquota de 100 µL do conteúdo de cada orifício da linha A foi transferido para a linha B, e este procedimento foi repetido até a linha H, a fim de obter concentrações que variaram de 32 a 0,125 µg/mL para o ácido úsnico e de 512 a 0,06 µg/mL para os agentes antimicrobianos.

Um volume de 5 µL (5×10^7 UFC/mL) das culturas padronizadas de *S. aureus* foi inoculado em todos os orifícios. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 24 horas.

A inibição do crescimento bacteriano foi demonstrada pela adição a cada um dos orifícios da microplaca de 20 µL de uma solução aquosa de rezasurina a 0,002% e reincubadas por duas horas a 35°C (Figura 3). Em meio ácido, a rezasurina que tem cor azul é reduzida a rezofurina passando à coloração rosa (MANN; MARKHAM, 1998).

Figura 3 – Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do ácido úsnico e agentes antimicrobianos



A este experimento foi adicionado uma placa de microdiluição como controle do crescimento das cepas de *S. aureus*.

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

A determinação da CBM foi realizada de acordo com os valores da CIM. Dessa forma concentrações mais altas que a CIM foram semeadas em Mueller Hinton Agar e incubadas por 24 horas a 37°C. A CBM foi definida como a menor concentração do ácido úsnico ou agente antimicrobiano capaz de matar 99,9% das cepas de *S. aureus*.

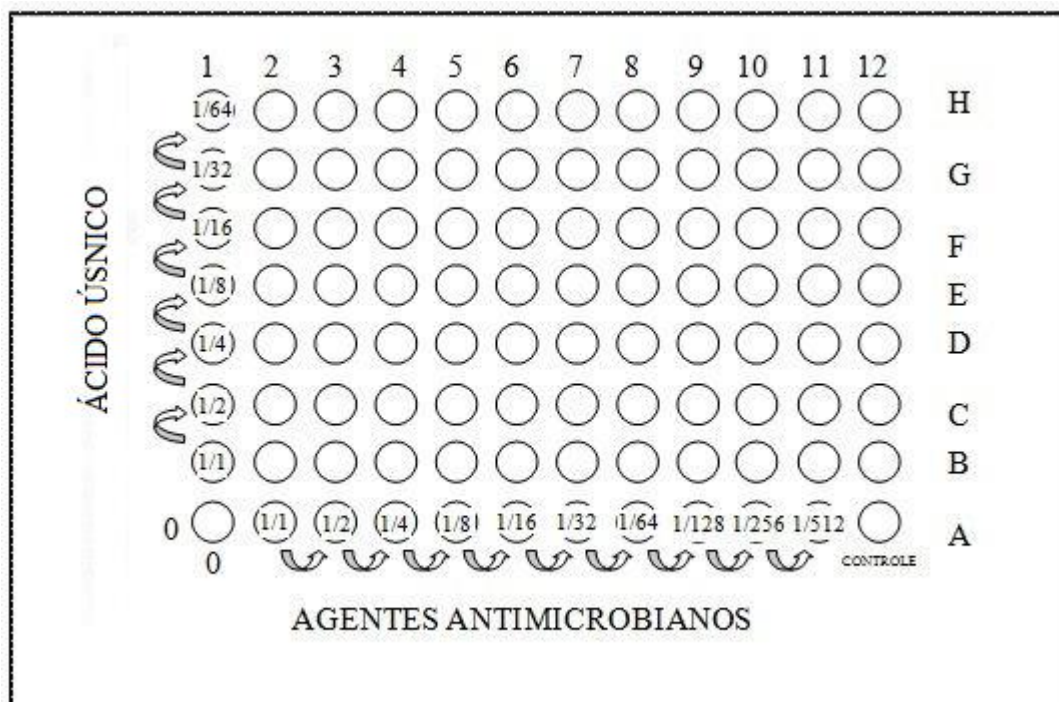
4.7 Determinação in vitro da atividade sinérgica

O estudo da interação entre o ácido úsnico e antimicrobianos foi realizado de acordo com o método do tabuleiro de xadrez (*checkerboard method*) (LORIAN, 2005).

Com base nos valores da CIM foram preparadas soluções em caldo Mueller Hinton de ácido úsnico e dos agentes antimicrobianos de forma a obter concentrações que variaram de 0,5xCIM a 0,016xCIM e de 0,5xCIM a 0,002xCIM, respectivamente. Nos orifícios das

placas de microdiluição, foram pipetados 100 μ L do ácido úsnico e 100 μ L do agente antimicrobiano (Figura 4).

Figura 4 – Representação do método do tabuleiro de xadrez (*Checkerboard method*).



Cada poço foi inoculado com 5 μ L da suspensão bacteriana contendo 10^7 UFC/mL das seguintes cepas, AM 13, AM18, AM 21, AM 24 e ATCC 33591.

A interpretação destas interações foi realizada através do cálculo Índice da Concentração Inibitória Fracionada (FICI) pela seguinte equação $FICI = (CIM \text{ da associação ácido úsnico e agente antimicrobiano} / CIM \text{ de ácido úsnico}) + (CIM \text{ da associação agente antimicrobiano e ácido úsnico} / CIM \text{ do agente antimicrobiano})$. Valores do $FICI \leq 0,5$ foram interpretados como uma interação sinérgica total; $0,5 < FICI \leq 0,75$ um sinergismo parcial. Uma interação indiferente quando os valores do FICI foram entre $0,75 < FICI \leq 2,0$ e um efeito antagônico quando FICI foi maior que 2,0 (FADLI et al., 2012)

5. RESULTADOS

5.1 Perfil Fitoquímico

A partir de 12,76 gramas de talo de *Cladonia substellata* foi obtido um pó de coloração amarelo de odor *suis generis* e com rendimento de 2,42%.

As análises dos espectros de Infravermelho (IV) e Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (RMNH¹), confirmaram a estrutura química do ácido úsnico de acordo com os seguintes resultados:

Cristais amarelo sólidos,

ponto de fusão : 201 – 203 °C, $[\alpha]_D$ a 25 °C + 495° (CHCl₃ c, 1,00)

IV (KBr, λ_{max} cm⁻¹): 3007, 2930, 1692, 1632, 1542, 1453, 1375, 1357, 1340, 1330, 1290, 1230, 1190, 1145, 1118, 1070, 1039, 959, 940, 840, 818, 600

RMNH¹ (300 MHz, DMSO-d₆, δ): 1,74 (3H; s, CH₃-13), 2,00 (3H; s, CH₃-16), 2,59 (3H; s, CH₃-15), 2,67 (3H; s, CH₃-18), 6,31 (1H; s, C-4-H), 11,30 (1H; s, C-10-OH), 13,39 (1H; s, C-8-OH), 18,90 (1H; s, C-3-OH)

5.2 A atividade antimicrobiana do ácido úsnico e agentes antimicrobianos

Os valores da CIM e CBM do ácido úsnico e do ciprofloxacino (CIP), gentamicina (GEN), oxacilina (OXA) e penicilina G (PEN) contra doze cepas de *Staphylococcus aureus* estão apresentados na tabela 2.

Tabela 1 - CIM e CBM do ácido úsnico e de agentes antimicrobianos frente a cepas de *Staphylococcus aureus* com diferentes perfis de resistência

<i>Staphylococcus aureus</i>	CIM / CBM (µg/ml)					Fenótipo de resistência	Origem
	AU	PEN	OXA	CIP	GEN		
ATCC 25923	16/16	0.125/0.125	0.125 / 0.25	0.125 / 0.125	0.25 / 0.25	Cepa controle (MSSA)	ATCC
ATCC 33591	8/16	32/32	128/128	0.125 / 0.125	0.5/1	Cepa controle (MRSA)	ATCC
AM04	16/16	0.125/0.125	0.25/0.25	0.125 / 0.125	0.125 / 0.125	CFX; AMP; AZI; OXA	Secreção vaginal
AM13	16/16	32/64	512/512	64/128	64/64	CFX; CIP; AMP; AZI; OXA	Sangue
AM18	8/16	64 / 64	512/512	64/128	128 / 256	CFX; OXA; AMP; AZI	Sangue
AM19	8/16	8 / 16	64 / 128	0.25 / 0.5	0.25 / 0.5	CFX; OXA; CIP; SZT; AMP; AZI; AMC	Secreção traqueal
AM20	8/16	16 / 16	16 / 16	64/128	0.25 / 0.25	CFO; OXA; CIP; GET; SZT; AMP; AZI; AMC	Sangue
AM21	8/16	16 / 16	16 / 16	64/128	0.25 / 0.5	CFO; OXA; AMP; AMC	Sangue
AM24	8/16	16/16	256 / 256	64/128	256 / 512	CFO; OXA; CIP; AMP; AZI	Secreção traqueal
IC17	8/16	4/4	4/4	0.25/0.5	4/8	CFO; OXA; CIP; AMP; AZI	Secreção traqueal

O ácido úsnico mostrou forte atividade contra todas as cepas de *S. aureus* com CIM valores entre 8 e 16 µg/mL. As cepas de *S. aureus* revelaram um perfil de resistência contra a maioria dos agentes antimicrobianos testados. Os valores da CIM para penicilina G variaram de < 0,125 - 64 µg/mL e oxacilina de < 0,125 – 512 µg/mL, que mostraram ser menos eficazes contra as cepas de *S. aureus* testadas. Entre todas as cepas de *S. aureus* testadas, cinco mostraram-se resistentes ao ciprofloxacino com valores de CIM de 64 µg/mL. Para a gentamicina os valores CIM variaram de <0,006 – 512 µg/mL não tendo apresentado resistência apenas as cepas ATCC 25923 e AM04.

Quatro cepas de *S. aureus* (AM13, AM 18, AM 21, AM24) apresentaram resistência a todos os agentes antimicrobianos testados. Este perfil de resistência selecionou os micro-organismos para o estudo da interação entre o ácido úsnico e agentes antimicrobianos. Os valores da CMB foram iguais ou superiores aos valores da CIM em uma diluição.

5.3 Interação entre ácido úsnico e agentes antimicrobianos

Os valores da CIM obtidos pela combinação do ácido úsnico com ciprofloxacino, gentamicina, oxacilina e penicilina G contra cepas de *S. aureus* (AM13, AM 18, AM 21, AM24) estão listados na Tabela 2

A concentração inibitória mínima do ácido úsnico (8-16 µg/mL) aumentou a atividade anti-estafilocócica de todos os agentes antimicrobianos. A atividade sinérgica foi detectada pela diminuição do valor da CIM dos agentes antimicrobianos na combinação e determinado pelo $FICI \leq 0,5$.

A combinação do ácido úsnico e oxacilina apresentaram os menores valores de FICI que variaram de 0,25-0,5. Nesta associação houve redução da CIM da oxacilina (CIM individual 512 µg/mL) para 1/4 (CIM em associação 128 µg/mL)

A CIM do ciprofloxacino (CIM individual 0,125- 64 µg/mL) foi reduzida para 1/2048 (CIM da associação 0,031–4,0 µg/mL), quando foi usado em associação com o ácido úsnico (CIM 8-16 µg/mL) tendo inibido o crescimento de todas as cepas de *S.aureus*. Esta combinação foi mais eficaz contra a cepa AM13 (FICI 0,37) que reduziu a CIM individual do ácido úsnico (16µg/mL) para 1/2 xCIM.

Para a penicilina a associação com ácido úsnico (CIM8-16 µg/mL) apresentou efeito

aditivo (FICI 1,0) em todas as cepas com exceção da cepa AM13. Nesta cepa a associação entre o ácido úsnico (CIM individual 16 µg/mL) e penicilina G (CIM individual 32 µg/mL) reduziu a CIM para 8 µg/mL e 0,0156 µg/mL respectivamente FICI (0,5).

A associação gentamicina (CIM individual 0,5-512 µg/mL) e ácido úsnico (CIM individual 8-16 µg/mL) apresentou efeito sinérgico nas cepas AM 18, AM 21e AM 24 com redução da CIM da gentamicina para 0,125- 256 µg/mL (1/2 x CIM) FICI (0,5) e efeito indiferente nas cepas ATCC33598 e AM 13 FICI (1,0)

Em todas as associações com os antibióticos houve redução da CIM do ácido úsnico (CIM individual 8-16 µg/mL) para até 1/128 x CIM (CIM associação 0,063 -8µg/mL).

Tabela 2 Interação do ácido úsnico com agentes antimicrobianos

<i>Staphylococcus aureus</i>	Associação	CIM Individual (µg/mL)	Associação CIM (µg/mL)	FIC Individual	FICI	Efeito	Redução da CIM (%)
ATCC 33591	AU+CIP	8/0.125	0.063/0.062	0.0078/0.5	0.5	Sinérgico	99.2/50.0
	AU+GEN	8/0.5	0.125/0.5	0.0156/1.0	1.0	Indiferente	98.4/0
	AU+OXA	8/128	0.063/64	0.0078/0.5	0.5	Sinérgico	99.2/50.0
	AU+PEN	8/32	0.063/32	0.0078/1.0	1.0	Indiferente	99.2/0
AM13	AU+CIP	16/64	4/8	0.25/0.125	0.37	Sinérgico	75.0/87.5
	AU+GEN	16/64	0.125/64	0.0078/1.0	1.0	Indiferente	99.2/0
	AU+OXA	16/512	0.125/128	0.0078/0.25	0.25	Sinérgico	99.2/75.0
	AU+PEN	16/32	8/0.0156	0.5/0.0005	0.5	Sinérgico	50/99.9
AM18	AU+CIP	8/64	4/0.031	0.5/0.0005	0.5	Sinérgico	50.0/99.9
	AU+GEN	8/0.25	0.063/0.125	0.0078/0.5	0.5	Sinérgico	99.2/50.0
	AU+OXA	8/512	0.063/256	0.0078/0.5	0.5	Sinérgico	99.2/50.0
	AU+PEN	8/64	0.063/64	0.0078/1.0	1.0	Indiferente	99.2/0
AM21	AU+CIP	8/64	4/0.031	0.5/0.0005	0.5	Sinérgico	50.0/99.9
	AU+GEN	8/0.25	0.063/0.125	0.0078/0.5	0.5	Sinérgico	99.2/50.0
	AU+OXA	8/8	4/4	1/1	1.0	Indiferente	50.0/50.0
	AU+PEN	8/16	4/8	0.5/0.5	1.0	Indiferente	50.0/50.0
AM24	AU+CIP	8/64	4/0.031	0.5/0.0005	0.5	Sinérgico	50.0/99.9
	AU+GEN	8/512	0.063/256	0.0078/0.5	0.5	Sinérgico	99.2/50.0
	AU+OXA	8/256	0.063/128	0.0078/0.5	0.5	Sinérgico	99.2/50.0
	AU+PEN	8/16	0.063/16	0.0078/1.0	1.0	Indiferente	99.2/0

CIM: Concentração Inibitória Mínima; FIC: Concentração Fracionária Mínima; ; % redução CIM: (CIM individual– CIM combinação) x100/CIM individual

CIP: Ciprofloxacino; GEN: Gentamicina; OXA: Oxacilina; PEN: Penicilina G; AU: Ácido Úsnico; LFBM: Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos

6 DISCUSSÃO

Os líquens são organismos simbióticos que são compostos de fungos e algas. Os líquens têm sido utilizados em vários campos, especialmente como fonte de drogas naturais na indústria farmacêutica e suplemento alimentar. Seus metabólitos têm revelado propriedades antitumorais, antivirais, antimicrobianas, antiinflamatórias e antioxidantes (DEVARAJA, 2012)

A composição química dos líquens é bastante variada e apesar de seu uso ser bastante conhecido na medicina tradicional e de suas potencialidades terapêuticas reconhecidas, a indústria farmacêutica moderna não tem explorado totalmente estas propriedades dada a grande dificuldade em se obter culturas puras e condições para um crescimento rápido, essenciais para o uso em larga escala (DEVARAJA, 2012).

Dentre os compostos liquênicos bem caracterizados, o ácido úsnico é o mais estudado, sendo utilizado pela indústria em cosméticos, antissépticos, produtos de higiene pessoal, xampus, desodorantes, creme dental (POLAT et al., 2013)

Ácido úsnico possui atividade antimicrobiana comprovada principalmente em bactérias Gram positivas. Vários estudos tem demonstrado ação do ácido úsnico contra *Staphylococcus aureus* metilina resistentes (ELO; MATIKAINEN; PELTTARI, 2007; GUPTA et al., 2012; POMPILIO et al., 2013; SEGATORE et al., 2012)

A avaliação de atividade antimicrobiana através do sinergismo entre substâncias é uma metodologia estabelecida e vem sendo utilizada como um recurso adjuvante no tratamento de microrganismos que apresentam elevada resistência aos antimicrobianos como *S. aureus* MRSA (HEMAISWARYA; KUMAR; DOBLE, 2008; LANGEVELD; VELDHUIZEN; BURT, 2014; WOLSKA; GRZES; KUREK, 2012)

Neste estudo, um efeito sinérgico do ácido úsnico contra cepas de *S. aureus* MRSA, foi observado para as associações com beta-lactâmicos, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos tendo a associação entre ácido com ciprofloxacino exibido efeito sinérgico sobre todas as cepas avaliadas.

Ácido úsnico é altamente lipofílico em ambas as formas neutra e aniônica devido aos seus grupos cetônicos que absorvem a carga negativa do anion levando à estabilização da molécula por ressonância. Segundo a teoria quimiosmótica, estas moléculas se difundem facilmente através das membranas biológicas em suas formas carregadas e neutras, o que resulta na quebra ou desacoplamento de gradientes de íons. Desta forma, em eucariotos o ácido úsnico pode passar através das membranas internas das mitocôndrias por difusão passiva para a matriz, onde é ionizado, libertando um próton. O anion usnato resultante pode, em seguida, voltar e difundir-se no espaço inter-membranar, onde se liga a um próton na membrana interna para então voltar a forma ácida difundindo-se para o interior da matriz. O ciclo resultante faz com que ocorra uma liberação de prótons que desestabiliza o gradiente de prótons da membrana interna interrompendo o forte acoplamento entre o transporte de elétrons e a síntese de adenosina trifosfato (ATP). Este caráter lipofílico do ácido úsnico e do anion usnato permite ao ácido úsnico se comportar portanto, como um desacoplador de membrana de um modo semelhante ao 2,4-dinitrofenol (GUO et al., 2008).

A atividade antimicrobiana do ácido úsnico contra uma grande variedade de bactérias gram-positivas, independentemente do seu fenótipo de resistência, tem sido relacionada a sua propriedade de desacoplamento de membrana.(GUO et al., 2008; JOSEPH et al., 2009)

Estudando a ação antimicrobiana do L-(-)-ácido úsnico sobre *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes Gupta *et al* (2012) utilizando as técnicas de *Time Kill Curve*, citometria de fluxo e índice de tolerância ao sal, reportaram que a exposição das cepas de *S.aureus* MRSA ao ácido úsnico reduziu o número de células viáveis sem alterações na parede celular indicando claramente que a ação ocorreu através de um dano na fisiologia da membrana celular.

Considerando os dados obtidos neste trabalho, o sinergismo entre o ácido úsnico e os antimicrobianos beta-lactâmicos pode ser explicado pelo fato de que o mecanismo de ação destes agentes ocorre através da lise da parede celular (VON NUSSBAUM et al., 2006) enquanto que o ácido úsnico desestrutura a membrana celular e consequentemente a síntese de ATP.

A atividade sinérgica entre a gentamicina e o ácido úsnico pode ser justificada pela passagem deste aminoglicosídeo ser facilitada pela ação do ácido úsnico na membrana celular

e esta etapa é fundamental para ação deste antimicrobiano na sub-unidade 30S dos ribossomos dos procariotos (AVENT et al., 2011).

Ciprofloxacino age nas enzimas DNA girase e topoisomerase IV (CHENG et al., 2013). Estas enzimas em conjunto auxiliam na manutenção da integridade e topologia do DNA bacteriano. A girase primariamente introduz superenovelamento negativo no DNA, e a topo IV, embora intimamente relacionada com a girase, preferencialmente desencadeia o DNA plasmidial e relaxa o superenovelamento positivo, funções essenciais para a replicação e transcrição do DNA (PAPILLON et al., 2013). O ácido úsnico atuando na desestruturação da membrana celular bacteriana através de desacoplamento de prótons dificulta a síntese de ATP que é essencial para os processos de replicação, transcrição e tradução do DNA tendo uma ação sinérgica com ciprofloxacino.

No único estudo publicado até o momento avaliando a ação sinérgica do ácido úsnico e antimicrobianos frente a *S. aureus* multidroga resistentes, Segatore et al (2012) encontraram sinergismo significativo com oxacilina e gentamicina apenas, enquanto que a combinação do ácido úsnico com levofloxacino foi considerada indiferente pelo método do FICI e antagônico pelo método de ΔE , neste método o efeito das drogas em associação é calculado a partir do efeito das drogas individuais e é comparado com os obtidos experimentalmente. Entretanto estes autores não esclarecem as possíveis causas para este achado uma vez que é raro observar antagonismo entre agentes fluoroquinolônicos e outros antibióticos.

7 CONCLUSÕES

Efeitos sinérgicos resultantes da combinação de agentes antimicrobianos com substâncias de origem não sintética têm sido documentados em vários estudos. Dados da literatura, bem como nossos resultados revelam o potencial do ácido úsnico para o tratamento terapêutico. Portanto, mais estudos precisam ser conduzidos para busca de formas farmacêuticas adequadas e avaliação da toxicidade *in vivo*.

O efeito antibacteriano do ácido úsnico e o efeito sinérgico deste metabólito secundário em associação com os antimicrobianos beta-lactâmicos, fluoroquinolônicos e aminoglicosídeos pode ser uma alternativa viável para o tratamento de doenças infecciosas causadas por *Staphylococcus aureus* multidroga resistentes.

REFERÊNCIAS

- ALTUN, H. U. et al. Invasive pneumococci before the introduction of pneumococcal conjugate vaccine in Turkey: antimicrobial susceptibility, serotype distribution, and molecular identification of macrolide resistance. **Journal of chemotherapy (Florence, Italy)**, p. 1973947814Y0000000176, 18 mar. 2014.
- ARCHER, N. K. et al. Staphylococcus aureus biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. **Virulence**, v. 2, n. 5, p. 445–59, 2011.
- ARIAS, C. A.; MURRAY, B. E. The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. **Nature reviews. Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 266–78, abr. 2012.
- AVENT, M. L. et al. Current use of aminoglycosides: indications, pharmacokinetics and monitoring for toxicity. **Internal medicine journal**, v. 41, n. 6, p. 441–9, jun. 2011.
- BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins. **International journal of food microbiology**, v. 61, n. 1, p. 1–10, 1 out. 2000.
- CASELLAS, J. M. [Antibacterial drug resistance in Latin America: consequences for infectious disease control]. **Revista panamericana de salud pública = Pan American journal of public health**, v. 30, n. 6, p. 519–28, dez. 2011.
- CHANG, S. et al. Infection with vancomycin-resistant Staphylococcus aureus containing the vanA resistance gene. **The New England journal of medicine**, v. 348, n. 14, p. 1342–7, 3 abr. 2003.
- CHENG, A. G. et al. A play in four acts: Staphylococcus aureus abscess formation. **Trends in microbiology**, v. 19, n. 5, p. 225–32, maio 2011.
- CHENG, G. et al. Antibacterial action of quinolones: from target to network. **European journal of medicinal chemistry**, v. 66, p. 555–62, ago. 2013.
- CLARO, T. et al. Staphylococcus aureus protein A binds to osteoblasts and triggers signals that weaken bone in osteomyelitis. **PloS one**, v. 6, n. 4, p. e18748, jan. 2011.
- COSGROVE, S. E.; CARROLL, K. C.; PERL, T. M. Staphylococcus aureus with reduced susceptibility to vancomycin. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 39, n. 4, p. 539–45, 15 ago. 2004.
- CUPANE, L. et al. Patients with Panton-Valentine leukocidin positive Staphylococcus aureus infections run an increased risk of longer hospitalisation. **International journal of molecular epidemiology and genetics**, v. 3, n. 1, p. 48–55, jan. 2012.
- DAVIDSON, P. M.; CRITZER, F. J.; TAYLOR, T. M. Naturally occurring antimicrobials for minimally processed foods. **Annual review of food science and technology**, v. 4, p. 163–90, jan. 2013.
- DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 74, n. 3, p. 417–33, set. 2010.

DE CARVALHO, E. A. B. et al. Effect of usnic acid from the lichen *Cladonia substellata* on *Trypanosoma cruzi* in vitro: an ultrastructural study. **Micron (Oxford, England : 1993)**, v. 36, n. 2, p. 155–61, jan. 2005.

DEVARAJA, G. Lichens: a novel and potential source as antimicrobials for human use. **Journal of Phytology**, v. 4, n. 1, p. 38–43, 2012.

EINARSDÓTTIR, E. et al. Cellular mechanisms of the anticancer effects of the lichen compound usnic acid. **Planta medica**, v. 76, n. 10, p. 969–74, jul. 2010.

ELO, H.; MATIKAINEN, J.; PELTTARI, E. Potent activity of the lichen antibiotic (+)-usnic acid against clinical isolates of vancomycin-resistant enterococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Die Naturwissenschaften**, v. 94, n. 6, p. 465–8, jun. 2007.

FADLI, M. et al. Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection - bacteria and their synergistic potential with antibiotics. **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 19, n. 5, p. 464–71, 15 mar. 2012.

FERNÁNDEZ, L.; BREIDENSTEIN, E. B. M.; HANCOCK, R. E. W. Creeping baselines and adaptive resistance to antibiotics. **Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy**, v. 14, n. 1, p. 1–21, fev. 2011.

FEUERER, T.; HAWKSWORTH, D. L. Biodiversity of lichens, including a world-wide analysis of checklist data based on Takhtajan's floristic regions. **Biodiversity and Conservation**, v. 16, n. 1, p. 85–98, 17 jan. 2007.

FRANCOLINI, I. et al. Water Soluble Usnic Acid-Polyacrylamide Complexes with Enhanced Antimicrobial Activity against *Staphylococcus epidermidis*. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 4, p. 7356–69, jan. 2013.

GALES, A. C. et al. Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacteria isolated in Brazilian hospitals participating in the SENTRY Program (2005-2008). **The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 13, n. 2, p. 90–8, abr. 2009.

GRUMEZESCU, A. M. et al. In vitro activity of the new water-dispersible Fe₃O₄@usnic acid nanostructure against planktonic and sessile bacterial cells. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 15, n. 7, p. 1766, 16 jun. 2013.

GUO, L. et al. Review of usnic acid and *Usnea barbata* toxicity. **Journal of environmental science and health. Part C, Environmental carcinogenesis & ecotoxicology reviews**, v. 26, n. 4, p. 317–38, 2008.

GUPTA, V. K. et al. Membrane-damaging potential of natural L-(-)-usnic acid in *Staphylococcus aureus*. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 12, p. 3375–83, dez. 2012.

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

HIRAMATSU, K. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 40, n. 1, p. 135–6, jul. 1997.

HIRSCHHAUSEN, N. et al. Characterization of the modular design of the autolysin/adhesin aaa from *Staphylococcus aureus*. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e40353, jan. 2012.

INGOLFSDOTTIR, K. Usnic acid. **Phytochemistry**, v. 61, p. 729–736, 2002.

IVANOVIC, J. et al. 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**, v. 76, p. 1–9, abr. 2013.

JIN, J.; LI, C.; HE, L. Down-regulatory Effect of Usnic Acid on Nuclear Factor- κ B-dependent Tumor Necrosis Factor- α and Inducible Nitric Oxide Synthase Expression in Lipopolysaccharide-stimulated Macrophages RAW 264 . 7. **Phytotherapy research**, v. 1609, n. November, p. 1605–1609, 2008.

JOSEPH, A. et al. Effect of (+)-usnic acid on mitochondrial functions as measured by mitochondria-specific oligonucleotide microarray in liver of B6C3F1 mice. **Mitochondrion**, v. 9, n. 2, p. 149–58, abr. 2009.

KLEIN, E.; SMITH, D. L.; LAXMINARAYAN, R. Hospitalizations and Deaths Caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* . **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 12, p. 1999–2005, 2007.

KOPARAL, A. T.; TÜYLÜ, B. A.; TÜRK, H. Natural Product Research : Formerly Natural Product Letters In vitro cytotoxic activities of (+) - usnic acid and (-) -usnic acid on V79 , A549 , and human lymphocyte cells and their non-genotoxicity on human lymphocytes. **Natural Product Research**, v. 20, n. April 2013, p. 37–41, 2006.

KOVAČ, J. et al. The evidence for clonal spreading of quinolone resistance with a particular clonal complex of *Campylobacter jejuni*. **Epidemiology and infection**, p. 1–9, 13 fev. 2014.

LANGEVELD, W. T.; VELDHUIZEN, E. J. A; BURT, S. A. Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. **Critical reviews in microbiology**, v. 40, n. 1, p. 76–94, fev. 2014.

LAUINGER, I. L. et al. Potential of lichen secondary metabolites against *Plasmodium* liver stage parasites with FAS-II as the potential target. **Journal of natural products**, v. 76, n. 6, p. 1064–70, 28 jun. 2013.

LEWIS, D. A. The role of core groups in the emergence and dissemination of antimicrobial-resistant *N gonorrhoeae*. **Sexually transmitted infections**, v. 89 Suppl 4, p. iv47–51, dez. 2013.

LIU, Y. et al. Rapid detection of *Mycoplasma pneumoniae* and its macrolide-resistance mutation by Cycleave PCR. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, p. 1–5, 13 dez. 2013.

LOWY, F. D. Antimicrobial resistance : the example of *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 9, p. 1265–1273, 2003.

MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of applied microbiology**, v. 84, n. 4, p. 538–44, abr. 1998.

MARSIK, F. J.; NAMBIAR, S. Review of carbapenemases and AmpC-beta lactamases. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 30, n. 12, p. 1094–5, dez. 2011.

MARVIG, R. L. et al. Mutations in 23S rRNA confer resistance against azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 8, p. 4519–21, ago. 2012.

MAZEL, D.; DAVIES, J. Antibiotic resistance in microbes. **CMLS, Cell. Mol. Life Sci**, v. 56, p. 742–754, 1999.

MCADOW, M.; MISSIAKAS, D. M.; SCHNEEWIND, O. *Staphylococcus aureus* secretes coagulase and von Willebrand factor binding protein to modify the coagulation cascade and establish host infections. **Journal of innate immunity**, v. 4, n. 2, p. 141–8, jan. 2012.

MERINO-DÍAZ, L. et al. Detección de resistencia inducible a clindamicina en aislados cutáneos de *Staphylococcus* spp. por métodos fenotípicos y genotípicos. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 25, n. 2, p. 77–81, fev. 2007.

MOLNÁR, K.; FARKAS, E. Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. **Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences**, v. 65, n. 3-4, p. 157–73, 2010.

MORELL, E. A; BALKIN, D. M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a pervasive pathogen highlights the need for new antimicrobial development. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 83, n. 4, p. 223–33, dez. 2010.

MUNCKHOF, W. J. et al. Cavernous sinus thrombosis and meningitis from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. **Internal medicine journal**, v. 38, n. 4, p. 283–7, abr. 2008.

NOBLE, W. C.; VIRANI, Z.; CREE, R. G. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. **FEMS microbiology letters**, v. 72, n. 2, p. 195–8, 1 jun. 1992.

OLIVEIRA, D. S. Interação Medicamentosa : parte II. **Caderno de Farmácia**, v. 2, n. 2, p. 97–110, 1986.

PAPILLON, J. et al. Structural insight into negative DNA supercoiling by DNA gyrase, a bacterial type 2A DNA topoisomerase. **Nucleic acids research**, v. 41, n. 16, p. 7815–27, set. 2013.

PARKER, D.; PRINCE, A. Immunopathogenesis of *Staphylococcus aureus* pulmonary infection. **Seminars in immunopathology**, v. 34, n. 2, p. 281–97, mar. 2012.

PODTEROB, A. P. Medicinal Plants Chemical Composition of Lichens. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 42, n. 10, p. 582–588, 2008.

POLAT, Z. et al. In vitro risk assessment of usnic acid compound. **Toxicology and industrial health**, n. November 2013, 5 nov. 2013.

POMPILIO, A. et al. Research Article. **Future Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 281–292, 2013.

RANKOVIĆ, B. et al. Biological Activities of *Toninia candida* and *Usnea barbata* Together with Their Norstictic Acid and Usnic Acid Constituents. **International journal of molecular sciences**, v. 13, n. 11, p. 14707–22, jan. 2012.

RANKOVIĆ, B.; MIŠIĆ, M.; SUKDOLAK, S. The antimicrobial activity of substances derived from the lichens *Physcia aipolia*, *Umbilicaria polyphylla*, *Parmelia caperata* and *Hypogymnia physodes*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 7, p. 1239–1242, 18 out. 2007.

ROSSI, F. The Challenges of Antimicrobial Resistance in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 9, p. 1138–1143, 2011.

SANTOS, D. O. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **J Bras Patol Med Lab**, v. 43, n. 6, p. 413–423, 2007.

SARAVOLATZ, L. D.; STEIN, G. E.; JOHNSON, L. B. Ceftaroline: a novel cephalosporin with activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 52, n. 9, p. 1156–63, maio 2011.

SEGATORE, B. et al. 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: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 19, n. 3-4, p. 341–7, 15 fev. 2012.

SELBMANN, L. et al. Culturable bacteria associated with Antarctic lichens: affiliation and psychrotolerance. **Polar Biology**, v. 33, n. 1, p. 71–83, 26 jul. 2009.

SHRESTHA, G.; ST. CLAIR, L. L. Lichens: a promising source of antibiotic and anticancer drugs. **Phytochemistry Reviews**, v. 12, n. 1, p. 229–244, 28 mar. 2013.

SIMÕES, M.; BENNETT, R. N.; ROSA, E. A S. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. **Natural product reports**, v. 26, n. 6, p. 746–57, jun. 2009.

SINGH, N. et al. Usnic acid inhibits growth and induces cell cycle arrest and apoptosis in human lung carcinoma A549 cells. **Nutrition and cancer**, v. 65 Suppl 1, n. June 2013, p. 36–43, jan. 2013.

SIREESHA, P.; SETTY, C. R. Detection of various types of resistance patterns and their correlation with minimal inhibitory concentrations against clindamycin among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. **Indian journal of medical microbiology**, v. 30, n. 2, p. 165–9, abr. 2012.

SISODIA, R. et al. Antibacterial and antioxidant activity of lichen species *Ramalina roesleri*. **Natural product research**, v. 27, n. 23, p. 2235–9, jan. 2013.

SLABBEKOORN, M. et al. Left-sided native valve *Staphylococcus aureus* endocarditis. **The Netherlands journal of medicine**, v. 68, n. 11, p. 341–7, nov. 2010.

SOKOLOV, D. N. et al. Anti-viral activity of (-)- and (+)-usnic acids and their derivatives against influenza virus A(H1N1)2009. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 22, n. 23, p. 7060–4, 1 dez. 2012.

SOKOLOV, D. N.; LUZINA, O. A; SALAKHUTDINOV, N. F. Usnic acid: preparation, structure, properties and chemical transformations. **Russian Chemical Reviews**, v. 81, n. 8, p. 747–768, 31 ago. 2012.

SOSPEDRA, I.; MAÑES, J.; SORIANO, J. M. Report of toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1) from *Staphylococcus aureus* isolated in food handlers and surfaces from foodservice establishments. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 80, p. 288–90, jun. 2012.

SPELLBERG, B. et al. The Epidemic of Antibiotic-Resistant Infections : A Call to Action for the Medical Community from the Infectious Diseases Society of America AND LACK OF ANTIBIOTIC DEVELOPMENT. **Clinical Infectious Diseases**, v. 90502, p. 155–164, 2008.

SRIVASTAVA, P. et al. Antimicrobial Property of Extracts of Indian Lichen against Human Pathogenic Bacteria. **Interdisciplinary perspectives on infectious diseases**, v. 2013, p. 709348, jan. 2013.

TANG, Y.-W.; STRATTON, C. W. *Staphylococcus aureus*: An old pathogen with new weapons. **Clinics in laboratory medicine**, v. 30, n. 1, p. 179–208, mar. 2010.

TENOVER, F. C. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. **The American Journal of Medicine**, v. 119, 2006.

ULUĞ, M.; AYAZ, C.; CELEN, M. K. A case report and literature review: osteomyelitis caused by community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of infection in developing countries**, v. 5, n. 12, p. 896–900, dez. 2011.

VAN DER MEEREN, B. T. et al. Emergence of methicillin resistance and Panton-Valentine leukocidin positivity in hospital- and community-acquired *Staphylococcus aureus* infections in Beira, Mozambique. **Tropical medicine & international health : TM & IH**, v. 19, n. 2, p. 169–76, fev. 2014.

VAN VUUREN, S.; VILJOEN, A. Plant-based antimicrobial studies--methods and approaches to study the interaction between natural products. **Planta medica**, v. 77, n. 11, p. 1168–82, jul. 2011.

VON NUSSBAUM, F. et al. Antibacterial natural products in medicinal chemistry--exodus or revival? **Angewandte Chemie (International ed. in English)**, v. 45, n. 31, p. 5072–129, 4 ago. 2006.

WAGURI-NAGAYA, Y. et al. Septic arthritis of the right ankle caused by *Staphylococcus aureus* infection in a rheumatoid arthritis patient treated with etanercept. **Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association**, v. 17, n. 4, p. 338–40, jan. 2007.

WECKESSER, S. et al. Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 14, n. 7-8, p. 508–16, ago. 2007.

WEERAKKODY, N. S. et al. Synergistic antimicrobial activity of galangal (*Alpinia galanga*), rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and lemon iron bark (*Eucalyptus staigerana*) extracts. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 91, n. 3, p. 461–8, fev. 2011.

WOLSKA, K.; GRZES, K.; KUREK, A. Synergy Between Novel Antimicrobials and Conventional Antibiotics or Bacteriocins. **Polish Journal of Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 95–104, 2012.

YUAN, X.; XIAO, S.; TAYLOR, T. N. Lichen-like symbiosis 600 million years ago. **Science (New York, N.Y.)**, v. 308, n. 5724, p. 1017–20, 13 maio 2005.

ZAMBARE, V. P.; CHRISTOPHER, L. P. Biopharmaceutical potential of lichens. **Pharmaceutical biology**, v. 50, n. 6, p. 778–98, jun. 2012.

ANEXOS

Anexo A- Isobologramas revelando o efeito sinérgico do ácido úsnico em associação com ciprofloxacino frente a *Staphylococcus aureus* MRSA AM13,AM14, AM21, AM 24

