

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA**

CONVÊNIO UFPE/UNIVERSIDADE VALE DO ACARAÚ

**ESTUDO COMPARATIVO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÁCIDO
ÚSNICO COM SUA FORMA NANOCAPSULADA**

Mestranda: Brígida Rodrigues Duarte

Orientadoras : Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães
Profa. Dra. Eulália C. P. de Azevedo Ximenes

Co-Orientadores: Profa. Dra. Eugênia Cristina G. Pereira
Prof. Dr. Nicácio Henrique da Silva

RECIFE, 2002

Brígida Rodrigues Duarte

**ESTUDO COMPARATIVO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÁCIDO
ÚSNICO COM SUA FORMA NANOCAPSULADA**

Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das exigências
para obtenção do título de Mestre em
Bioquímica pela Universidade
Federal de Pernambuco.

Aprovado por:

Data : _____ / _____ / _____

SUMÁRIO

1.0. Introdução	1
1.1. Os Líquens	1
1.2. Substâncias liquênicas	5
1.3. Atividades antimicrobiana	7
1.4. Ácido Úsnico	9
1.5. Nanocápsulas	11
2.0. Justificativa	13
3.0. Objetivos	14
3.1. Geral	14
3.2. Específicos	14
4.0. Referências Bibliográficas	14
5.0. Trabalho	23
6.0. Conclusões	40

"O importante é como você procura realizar suas metas. Isto vai determinar sua qualidade de vida. Quando o indivíduo tem compromisso com sua essência, a vida não se torna um fardo pesado de carregar".

(Shinyashiki)

As pessoas mais importantes da minha vida:

Meus pais, Geraldo Dumont e Maria Duarte, que são os verdadeiros responsáveis por esta conquista.

Meus irmãos, José, Francisco, Paulo, Joel, Ana, Carmen e Débora, amigos, sempre presente em minha vida como uma força constante.

Meu esposo Marcos e meus filhos Marquinhos e Marcela, pelo amor, paciência e carinho.

Meus sobrinhos, Joéli, Lucas, Júlia, Mariana, Laerte, Alan, Ana Laís, Felipe, Norma, Joel Jr., Cibele, Joaquim e Sabrina, pelo carinho e lembrança constante na minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus. Meu Porto Seguro.

À Professora Dra. Nereide Stela Santos Magalhães pela valiosa orientação. Obrigada pelo carinho e pela oportunidade de conviver com uma pessoa correta, pela sua simplicidade, profissionalismo, competência e por estar sempre disposta a ajudar.

À Professora Dra. Eulália Campos Pereira de Azevedo Ximenes, pelo incentivo, amizade e valiosa orientação, com quem tive o privilégio de conviver e muito aprender. Obrigada pelo carinho, pela oportunidade de conviver com uma pessoa extremamente alegre.

À Professora Dra. Eugênia Gonçalves Pereira pelo estímulo, amizade e valiosa orientação, proporcionando-me absorver de forma satisfatória as etapas desenvolvidas durante o trabalho. Muito obrigada.

Ao Professor Dr. Nicácio Henrique da Silva pela orientação, apoio e carinho demonstrado durante o decorrer deste curso.

À ex-coordenadora do Curso de Mestrado em Bioquímica, Profa. Dra. Maria da Paz Carvalho da Silva, pelo apoio prestado.

Ao Professor Dr. José Luiz de Lima Filho, Diretor do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA, por gentilmente ter permitido a realização dos experimentos.

A Chefe do Departamento de Antibióticos, Professora Dra. Janete Magali de Araujo, por ter disponibilizado as instalações do departamento para que este trabalho pudesse ser realizado.

Ao Professor Dr. Carlos Rolim Martiniano, *in memoriam*, Coordenador Adjunto do Curso de Mestrado em Bioquímica da Fundação Universidade Vale do Acaraú, pelo apoio e oportunidade.

César Augusto, Noemia Pereira, Fernanda Wellingrace, Sheyla Ribeiro e Marcela Silvestre, pelo companheirismo, apoio, auxílio e amizade indispensáveis à realização deste trabalho.

Aos meus colegas do Curso de Mestrado em Bioquímica, em especial à Ana, Débora, Olindina e Doraneide, pela amizade e convívio sempre agradável.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica, pela presteza e disponibilidade em ajudar.

Aos meus cunhados Edimar, Sílvio, Carlos, Eliane, Corina, Socorro, Maria José, pelas lembranças maravilhosas, de onde sempre tiro forças para superar obstáculos.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

01 – Tipos de talos	1
02 – Modelo esquemático da anatomia de um talo liquênico	4
03 – Estrutura química do ácido úsnico	9

LISTA DE TABELAS

- | | | |
|----|---|----|
| 01 | Concentração mínima inibitória (CMI) dos ácidos úsnicos padrões e purificados de <i>Cladonia substellata</i> e em forma nanocapsulada frente a <i>Staphylococcus aureus</i> . | 33 |
| 02 | Origem das cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de vários espécimes humanos e seu perfil de resistência aos vários antibióticos | 34 |

RESUMO

Os líquens produzem várias substâncias antibióticas dentre elas o ácido úsnico, cuja atividade antimicrobiana fora demonstrada sobre vários microrganismos, principalmente bactérias Gram-positivas. Com a finalidade de avaliar esta atividade antimicrobiana o ácido úsnico foi extraído da *Cladonia substellata* Vainio, purificado e caracterizado, testado frente a isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*. A atividade antimicrobiana do ácido úsnico foi determinada pela Concentração Mínima Inibitória (CMI) através do método de difusão em meio sólido sobre dez cepas de *S. aureus* isolados de espécimes humanas e uma de coleção. Neste estudo também foram determinadas as CMIs para o ácido úsnico padrão, e para a sua forma nanoencapsulada. A partir de soluções padronizadas dos ácidos úsnicos a 500µg/ml foram realizadas diluições seriadas de modo a obter no final placas contendo a substância teste em concentrações de 50 a 7µg/ml, onde o inóculo padronizado (10^8 UFC/ml) foi semeado. Todas as formas do ácido úsnico mostraram-se ativas frente às cepas de *S. aureus* testadas. As CMIs situaram-se entre 50 µg/ml e < 7 µg/ml, e foram dependentes da forma do ácido úsnico, e das cepas utilizadas. O ácido úsnico na sua forma nanoencápsulada teve uma diminuição na atividade antimicrobiana inferior quando comparada ao ácido úsnico purificado de *C. substellata* e o ácido úsnico padrão.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Os líquens

Os líquens são originados a partir da associação simbiótica entre uma ou mais algas e um fungo, resultando na formação de um talo de estrutura específica, com características morfológicas peculiares que os distinguem das formas que lhes deram origem (Hale, 1983; Carrazoni, 1983; Hill, 1984; Nash, 1996).

As espécies liquênicas têm talos de formas bastante definidas (Figura 1). Estes podem ser crustosos (ex: *Chiodecton*, *Graphis*, *Lecanora*); folhosos (ex: *Collema*, *Lobaria*, *Parmelia*); e fruticulosos (ex: *Cladonia*, *Ramalina*, *Usnea*). O talo do líquen pode ainda apresentar-se de formas e cores variadas, dependendo da espécie e das substâncias que o compõe (Thomson, 1967; Seaward, 1977; Alexopoulos & Mims, 1996).

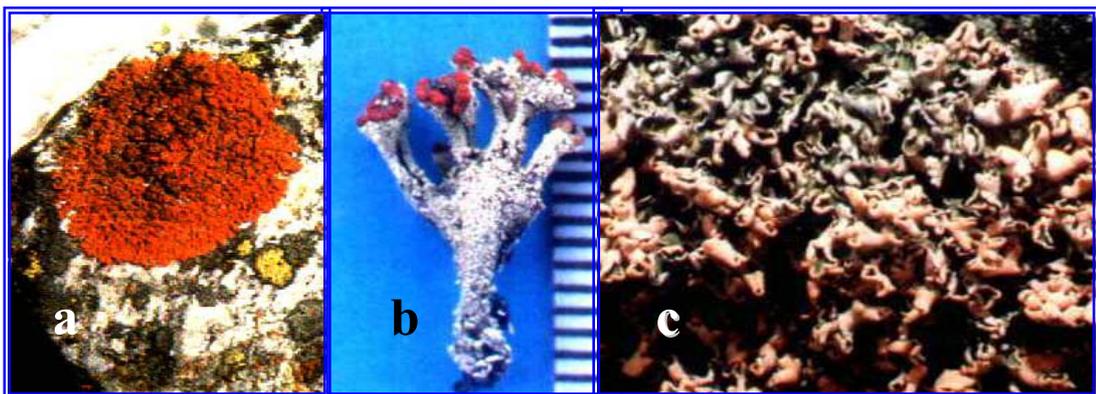


Figura 01. Tipos de talos: a) crustosos; b) fruticulosos e c) folhosos.

Os líquens são seres de difícil posicionamento dentro dos sistemas de classificação dos seres vivos, uma vez que são constituídos por dois organismos de reinos diferentes, um clorofilado, o fitobionte, e outro aclorofilado, o micobionte. Mesmo com esta constituição, sua definição taxonômica leva em consideração o fungo liquênico, obedecendo ao Código Internacional de Nomenclatura Botânica (Alexopoulos *et al.*, 1996).

O sistema de classificação proposto por Margulis & Schwartz, em 1982, posiciona os líquens com base na sua evolução celular e filogenética, dentro do reino Fungi, sendo classificados como *Mycophycophyta*. O componente alga pertence quase sempre às divisões *Chlorophyta* e *Cyanophyta*, enquanto os fungos são, na maioria, *Ascomycotina* e *Basidiomycotina*, (Alexopoulos & Mims, 1996).

Devido à grande capacidade de adaptação às adversidades, os líquens são bastante versáteis adaptando-se a diferentes substratos sendo, portanto, considerados cosmopolitas, distribuindo-se dos trópicos aos pólos, existindo espécies polares, bipolares, e outras de ampla distribuição biogeográfica. Como substrato os líquens habitam desde rochas dos mais diversos tipos, a madeira queimada ou em decomposição, troncos vivos, folhas, solo, musgos, vidros, dentre outros (Seaward, 1977).

A interação do líquen com o meio ambiente depende, sobretudo, do microclima da área e da pureza do ar, visto que a umidade atmosférica é fator crucial para sua sobrevivência. Quanto mais úmido for o ambiente, mais gelatinoso e, às vezes, mais colorido, será o líquen; à medida que a umidade diminui, ele se torna quebradiço. Assim sendo, sua interação ecológica com os diversos seres vivos vai desde os mamíferos aos

pássaros, anfíbios e invertebrados aquáticos ou terrestres (Guzmán *et al.*, 1984; Legaz *et al.*, 1986).

A sensibilidade dos líquens à poluição atmosférica pode ser comprovada pelo desaparecimento de espécies menos resistentes em áreas com elevado nível de poluição. Estudos realizados no Parque Zoobotânico do Museu Paraense Emílio Goeldi, em Belém-PA, relacionaram a ausência de líquens com o fluxo de veículos nas proximidades da área. Os pontos mais afetados pela poluição atmosférica foram determinados através do método do índice de pureza atmosférica, e da análise de pigmentos fotossintetizantes extraídos do talo de *Cladonia substellata* transplantada para a área em estudo (Ribeiro, 1999).

A notável resistência dos líquens às situações de estresse ambiental se deve à proteção do córtex superior (camadas de hifas do fungo), associada à cristalização das substâncias liquênicas no talo, tanto o nível cortical como medular (Figura 2). Por isso, funcionam, por vezes, como um filtro, selecionando quantidades e tipos de radiações recebidas, ou permanecendo em latência durante períodos onde a temperatura e a luminosidade não o permitem fotossintetizar (Hale, 1983).

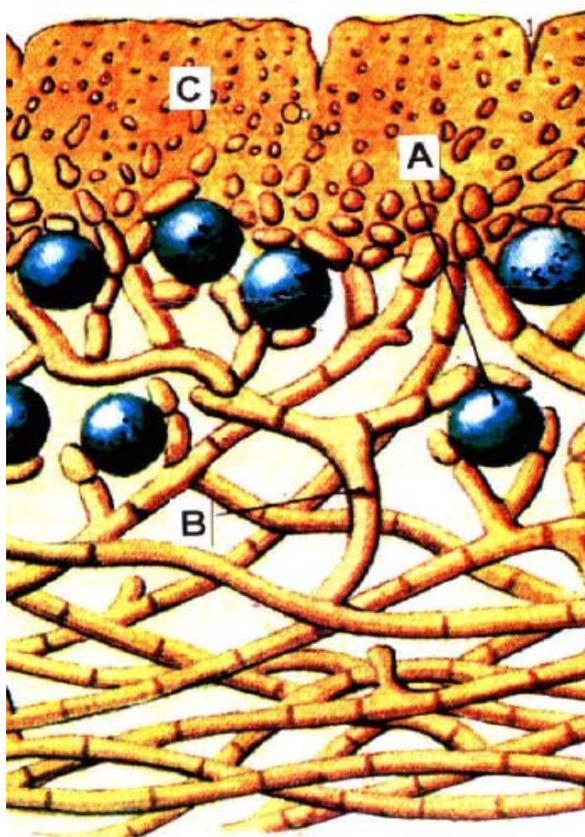


Figura 2. Modelo esquemático da anatomia de um talo liquênico.

A - Alga; B - Hifas medulares; C – hifas corticais.

Os líquens produzem substâncias com propriedades antibióticas que podem variar qualitativamente e quantitativamente em uma mesma espécie, dependendo das condições ambientais. Segundo Hale, (1983), variações de temperatura, umidade e luminosidade podem interferir na atividade fisiológica dos líquens, afetando, por conseguinte, a síntese de seus metabólitos.

1.2 Substâncias liquênicas

O estudo químico dos líquens foi iniciado no século XIX com os pesquisadores alemães Zopf (1907), Hesse (1912) apud Pereira 1996. Esses estudos continuaram no sentido de desenvolver métodos mais simples e específicos de extração, purificação e identificação de substâncias liquênica, bem como técnicas cromatográficas específicas (Asahina & Shibata, 1954; Legaz & Vicente, 1983).

Os líquens produzem um grande número de substâncias, intra e extracelulares. Os produtos intracelulares são os carboidratos, vitaminas, aminoácidos e proteínas, que estão ligados à parede celular e aos protoplastos, sendo frequentemente solúveis em água. A maioria destes compostos não é específica dos líquens, podendo ocorrer em fungos e algas de vida livre, bem como em plantas superiores (Hale, 1983; Nash, 1996). Os produtos extracelulares são resultantes do metabolismo secundário dos líquens, podendo ser corticais ou medulares. A maioria é de natureza fenólica, insolúvel em água. Estas substâncias só ocorrem nos líquens e a elas se credita a utilidade econômica desses seres (Hale, 1983).

Os líquens produzem metabólitos secundários que não são produzidos por plantas. Muitos deles são indubitavelmente advindos primariamente dos fungos, tendo como fonte de carbono, os carboidratos fornecidos pela alga. Entretanto têm-se sugerido que a alga pode participar no estágio terminal da síntese de alguns dos produtos característicos de líquens (Mosbach & Jakobson, 1968 apud Culberson, 1969).

Dentre as substâncias liquênicas conhecidas, as mais importantes incluem depsídeos, depsidonas e dibenzofuranos (Huneck & Yoshimura,

1996). Mais de 630 metabólitos secundários de líquens são conhecidos. A maioria é produzida unicamente pelos líquens e, uma pequena minoria, em torno de 50 a 60, é produzida por fungos de vida livre e plantas superiores. Os depsídeos, depsidonas, dibenzenofuranos, ácidos úsnicos e a depsona ácido picroliquênico são derivados de fenólicos encontrados exclusivamente em líquens. O ácido úsnico é considerado um dos mais importantes metabólitos liquênicos biologicamente ativos, podendo representar mais de 50% do talo seco do líquen (Mitchel, 1965).

A peculiaridade das substâncias liquênicas tem estimulado muitas especulações sobre seus papéis fisiológicos. Há milênios estas substâncias têm demonstrado propriedades antibióticas, farmacológicas, imunológicas, antigerminativas e antineoplásicas (Hale, 1983; Lauterwein, 1995; Nash, 1996; Pereira *et al.*, 1997; Cocchietto *et al.*, 2002).

Yano (1994) verificou a ação de extratos brutos e substâncias isoladas de *Cladonia substellata* e de *C. verticillaris*, sobre a germinação e crescimento de *Allium cepa*, constatando que os mesmos não exerciam influência no percentual de germinação. Entretanto, os extratos obtidos de *C. substellata* inibiram o crescimento da plântula, enquanto os de *C. verticillaris* estimularam tal crescimento. Este comportamento foi atribuído ao ácido úsnico e ao ácido fumarprotocetrárico, abundantes, respectivamente, em *C. substellata* e *C. verticillaris*, uma vez que quando testados isoladamente apresentaram respostas semelhantes às dos extratos brutos.

As substâncias liquênicas apresentam também ação eficiente contra inúmeras enfermidades, o que vem sendo comprovada há varias décadas

por pesquisadores como Harksworth & Hill, (1984). Alguns medicamentos são elaborados a partir dessas substâncias.

1.3. Atividade antimicrobiana

As primeiras pesquisas que relataram a atividade antimicrobiana de substâncias liquênicas foram desenvolvidas por Burkholder *et al.*, (1944). Estes trabalhos foram seguidos de vários outros que demonstraram, resultados interessantes. Verificou-se, por exemplo, que os extratos brutos de várias espécies de líquens eram ativos não somente contra bactérias Gram-positivas, como também contra bactérias álcool-ácido-resistentes, como *Mycobacterium bovis*, *M. avium*, e *M. tuberculosis hominis* o bacilo da tuberculose (Capriotti, 1961; Maia, *et al.*, 2002).

Bustinza (1951) isolou o ácido úsnico, seus isômeros e derivados, atribuindo a este composto liquênico alta eficácia contra microrganismos, notadamente as bactérias Gram-positivas. Esta substância tem um amplo espectro de ação, sendo todos os seus isômeros ópticos ativos. Tanto a forma D quanto à forma L detêm o crescimento de diferentes grupos de bactérias.

O crescimento de *Neurospora crassa* foi fortemente inibido pelo ácido úsnico, da mesma forma que o ácido hematômico, um derivado fenólico monocíclico de alguns depsídeos liquênicos (Hale, 1974).

Ingolfssdottir e colaboradores (1997) demonstraram o poder inibidor do extrato bruto de *Cetraria islandica* sobre *Helicobacter pylori* e identificaram o ácido protoliquesterínico como componente ativo deste extrato.

Os líquens têm uma taxa de crescimento baixa (Hill, 1984) e a produção de antimicrobianos a partir de tais seres exigiria quantidades relativamente grandes de material biológico. Desta forma, a produção de metabólitos liquênicos, sem a destruição de biomassa, torna-se importante para propósitos farmacêuticos. Para contornar este problema, técnicas de imobilização celular vêm sendo desenvolvidas com êxito para diversas espécies de líquens (Vicente *et al.*, 1995, Pereira *et al.*, 1997).

Algumas substâncias liquênicas com atividade biológica foram também identificadas de líquens coletados no sul da Espanha. A estrutura de todos os compostos foi elucidada por métodos físicos e químicos. Os melhores resultados foram observados em líquens contendo ácido úsnico frente à bactérias Gram-positivas (Garcia *et al.*, 1999).

Perry e colaboradores (1999) analisaram 69 espécies de líquens coletados na Nova Zelândia, quanto a atividade antimicrobiana, antiviral e citotóxica concluindo que extratos ativos geralmente eram de espécies conhecidas que continham componentes fenólicos. Trabalhos direcionados com a bioatividade com *Cladia retipora*, *Pseudocyphellaria glabra* e *P. homoeophylla* conduziram para a identificação do ácido úsnico, como sendo o principal componente antimicrobiano, antiviral e citotóxico nestas três espécies.

A história dos antibióticos é, portanto, dinâmica, caracterizada pelo aparecimento constante de novos desafios, acompanhados de investigação científica e descoberta de novos compostos mais eficazes.

1.4. Ácido úsnico

O ácido úsnico (Figura 03) caracteriza-se por ser uma substância de baixa solubilidade em água. Sua estrutura química consta de uma unidade aromática dihidroxilada, de caracter fenólico uma função cetônica e um grupo metila todos ligado ao anel A. O anel B cíclico de seis carbonos com insaturação, contém um grupamento metila e três grupos cetônicos. O caráter hidrófobo da substância é devido aos quatro grupos cetônicos e ao anel furano unindo os anéis A e B. Seus cristais, de coloração amarela característica, variam de forma de acordo com o solvente utilizado na recristalização. O ácido úsnico ocorre na natureza nas formas D e L, e o ponto de fusão dos seus cristais é por volta de 203° C. Entretanto na forma DL-úsnico, seu ponto de fusão baixa para 194° C (Asahina & Shibata, 1954).

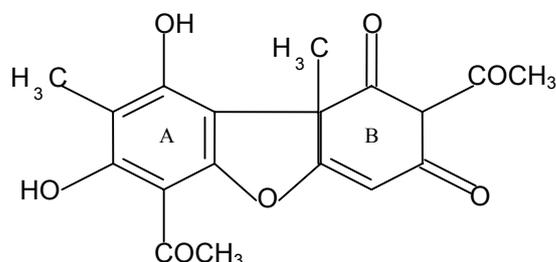


Figura 3: Estrutura química do ácido úsnico.

O ácido úsnico, considerado um dos mais importantes agentes liquênicos tuberculostáticos, sua associação medicamentosa com a estreptomicina foi favorável no combate à tuberculose *in vivo* (Vartia & Tervilä, 1952). Pātiälä & Pātiälä (1954), demonstraram em numerosos testes *in vitro* e *in vivo*, que o ácido úsnico possui um efeito bacteriostático contra o

bacilo da tuberculose, além de ser o provável responsável pela diminuição e, em certos casos, até o desaparecimento de determinados sintomas, de pacientes humanos com tuberculose, tratados com esta substância.

O ácido úsnico, isolado de *Ramalina reticulata* inibiu o crescimento de várias espécies de *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Mycobacterium* (Shibata & Miura, 1948 apud Bustinza, 1951). Posteriormente foram obtidos resultados satisfatórios com as mesmas bactérias (Kortenkangas & Virtane, 1956), além de fungos e outras bactérias (Inoue & Iwaida, 1980; Cocchietto et al., 2002).

Trabalhos realizados por Lauterwein *et al.* (1995) e Ribeiro *et al.* (2002), indicam que os ácidos úsnico e vulpínico são ativos contra algumas espécies de bactérias Gram-positivas e fungos, porém não apresentam efeitos contra as Gram-negativas. Estes resultados estão de acordo com os reportados por Hale (1983), que retratam a ineficácia do ácido úsnico e protoliqueterínico contra bactérias Gram-negativas, como *Escherichia*, *Salmonella* e *Shigella*.

A *Cladonia substellata* Vainio mostra uma elevada concentração de ácido úsnico e pequenas quantidades de ácido estíptico, criptoestíptico e constíptico. Em algumas espécies brasileiras podem ser encontrados os ácidos nortíptico e conortíptico (Ahti *et al.*, 1993). A *C. substellata*, pertence à seção Unciales, possui 98,1% de ácido úsnico (Ahti, *et al.*, 1993), substância liquênica das mais estudadas, com atividade biológica bastante diversificada (Nash, 1996).

Pereira e colaboradores (1996) atribuíram ao ácido úsnico, isolado de *Cladonia substellata*, a capacidade de inibir o crescimento de *B. subtilis* e

Mycobacterium smegmatis. Os extratos de *C. substellata* demonstraram maior eficácia frente a estes microrganismos que os de *C. corallifera*, provavelmente por apresentarem maior teor de ácido úsnico, composto comprovadamente ativo contra microrganismos (Pereira *et al.*, 1996)

1.5. Nanocápsulas

1.5.1 Definição

Um medicamento administrado, seja por via extravascular ou intravascular, sofre três processos orgânicos indispensáveis ao êxito terapêutico: absorção, distribuição e eliminação (Puisieux & Roblot Treupel, 1989). Na etapa de absorção, as moléculas do fármaco são liberadas da forma medicamentosa, podendo atingir diretamente a corrente sangüínea ou sofrerem metabolização enzimática prévia a nível hepático. Na corrente circulatória, as moléculas do medicamento são distribuídas tanto á nível do sítio de ação desejado (receptores específicos), como igualmente nos diferentes tecidos do organismo. Decorrida a etapa de distribuição, com obtenção de uma resposta satisfatoriamente completa ou não, as moléculas são eliminadas do organismo seja na sua íntegra ou após biotransformação.

Na literatura são citados dois tipos de nanopartículas: as nanoesferas e as nanocápsulas. As nanoesferas exibem formato esférico e são constituídas por uma rede polimérica densa envolvendo toda a estrutura das partículas. As nanocápsulas são vesículas sólidas que apresentam uma cavidade interna oca, geralmente de natureza oleosa, estabilizada por um filme interfacial de agentes tensioativos e revestida superficialmente por uma parede polimérica pouco espessa. A parede pode ser obtida pela

polimerização interna de um ou mais monômeros ou por deposição superficial de um polímero pré-formado. Esta parede é responsável pela estabilidade da partícula em meio coloidal e controle da liberação do fármaco. Este pode ser incorporado diretamente na cavidade oleosa interna, pode ser retido na parede polimérica, ou ser adsorvido na superfície das nanocápsulas (Pereira, 1996).

Nanopartículas são vetores de fármacos que se apresentam na forma de partículas esféricas menores que 1 μ m. O suporte nanoparticulado é obtido pela utilização de macromoléculas que definem a estrutura interna da partícula (Benoit *et al.*, 1986).

O interesse no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos preparados com polímeros biodegradáveis vêm aumentando nos últimos anos, devido a possibilidade de os utilizarmos na fabricação de carreadores coloidais e assim promovermos uma liberação controlada e um aumento da eficácia do fármaco encapsulado, e a redução da toxicidade após administração parenteral (Barratt, 2000).

Carreadores coloidais de fármacos envolvem principalmente emulsões submicrônicas, lipossomas, complexos lipídicos e nanopartículas. Nanopartículas, sistemas poliméricos sólidos nanométricos, é o nome geral para descrever nanoesferas e nanocápsulas. Nanocápsulas são sistemas vesiculares compostos de uma fase oleosa circundada por uma parede polimérica com surfactantes lipofílico e hidrofílico na interface. Diferentes polímeros podem ser utilizados na preparação destas partículas, incluindo os poli- alquilcianoacrilatos, poli-metilidenos malonato e os poliésteres (poli-ácido láctico, poli-ácido glicólico e poli- ϵ -caprolactona) com seu copolímero,

quem podem ser formadas a partir de um monômero ou um polímero préformado (Guterres *et al.*, 1995).

A grande vantagem dos sistemas poliméricos para liberação controlada de fármacos reside no fato de que, no processo de complexação fármaco-polímero, o fármaco preserva sua atividade farmacológica, pois a parte ativa da molécula não é alterada quimicamente pelo polímero (Dunn, 1990).

Santos Magalhães e colaboradores (1995) estudaram a encapsulação de clofibríde, um hipolipemiante, em nanocápsulas de PLGA e observaram um aumento significativo na liberação *in vitro* do fármaco quando comparado à forma comercial cápsula gelatinosa.

Estudo sobre atividade antitumoral demonstrou que a encapsulação do ácido úsnico em nanocápsulas de PLGA promoveu um aumento na inibição do tumor de 66% quando comparada com o ácido úsnico livre (Santos *et al.*, submitted, 2002).

2. JUSTIFICATIVA

A terapia antimicrobiana, bastante utilizada a partir da década de 40, iniciou-se com a produção de compostos químicos para o tratamento das doenças infecciosas em humanos. Atualmente, o uso dos antimicrobianos é amplo, entretanto, estes fármacos são empregados de forma abusiva e inadequada, induzindo o aparecimento de microrganismos resistentes.

Desta maneira, é necessário o emprego racional e a pesquisa de novos fármacos principalmente os de origem natural, que sejam capazes de

inibir microrganismos patogênicos resistentes a substâncias comercialmente utilizadas, além de causar pouco ou nenhum efeito colateral.

Este estudo contribuirá para obter uma forma farmacêutica de nova geração, nanocápsulas, contendo ácido úsnico, e cuja futura aplicação será direcionada para o tratamento de infecções microbianas.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar a atividade antiestafilocócica do ácido úsnico isolado de *Cladonia substellata* contra cepas resistentes de *Staphylococcus aureus* comparando com a atividade do ácido úsnico encapsulado em nanocápsulas de PLGA, (copolímero, ácido, d l, láctico co-glicólico).

3.2. Específicos

Determinar a concentração mínima inibitória (CMI) do ácido úsnico isolado e purificado de *Cladonia substellata*, nas formas livre (em solução) e encapsulado em nanocápsulas de PLGA, contra diferentes isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* tendo referência o *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

Identificar a forma do ácido úsnico com maior atividade antibiótica, bem como as cepas de *S. aureus* mais sensíveis.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHTI, T; STENROOS, S.; XAVIER-FILHO, L. The lichen family Cladoniaceae in Paraiba, Pernambuco and Sergipe, northeast Brasil.

Tropycal Biology, v. 7, p. 55-70, 1993.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Micology**. New York, J. Wiley & Sons, p. 869, 1996.

ASAHINA, Y.; SHIBATA, S. **Chemistry of Lichen Substance**, Tokio, Japanese Society for the Promotion of Science, p. 240, 1954.

BARRAT, G. M. Therapeutic applications of colloidal drug carriers, **Pharmaceutic Science Technolog Today**, 35, p 163-171, 2000.

BENOIT, J. P.; COUVREUR, P.; DEVISSEGUET, J. P.; FESSI, H.; PUISIEUX, F. & ROBLOT – TREUPEL, L. Lês formes <<vectorisées>> ou à <<distribution modulée>>, Nouveaux systèmes d' administration des médicaments. **J. Pharm. Belg.** v. 41, p. 319-329, 1986.

BURKLOLDER, P. R.; EVANS, A. W.; MACVEIGH, I.; THORNTON, H. R. Antibiotic activity of lichens. **Proceedings National Academy Sciences**, v. 30, p. 250 – 255, 1944.

BUSTINZA, F. Contribución al estudio de las propiedades antibacterianas y antifungicas del ácido usnico e algunos de sus derivados. **Annales del Instituto Botanico de A. J. Cavanilles**, v. 10, p. 157-175, 1951.

CAPRIOTTI, A. The effect of Usno on yeast isolated from the excretion of

tuberculosis patients. **Antibiotic Chemotherapy**, v.11, p. 409 – 410, 1961.

CARAZZONI, E. P. **Química de líquens**. 1 ed., Recife, FASA, p. 36, 1983.

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

CULBERSON, C. F. Chemical and Botanical Guide to Lichen Products. North Carolina, USA, **The University of North Carolina Press**, p. 628, 1969.

CULBERSON, C. F. Improved conditions and new data for the identification of lichen products by a standardized thin-layer chromatographic method. **Journal of chromatography**, v. 72, p. 113-125, 1969.

DUNN, R. L. Polymeric Matrices. In: OTTENBRITE, RAPHAEL M> Polymeric Drug Delivery Systems. Washington: **American Chemistry Society**. v. 2, p. 11–23, 1990.

GARCIA ROWE, J.; GARCIA GIMENEZ, M. D.; SAENS RODRIGUEZ, M. T. **Some lichen products have antimicrobial activity**. Laboratory of Vegetal Biology, Faculty of Pharmacy, University of Seville, Spain, p. 605 –609, 1999.

GUETERRES, S. S.; FESSI, H.; BARRETT, G.; DEVISSAGUET, J. P.;

PUISIEUX, F. **International Journal of Pharmaceutics**.133, p57-63, 1995.

GUZMÁN, G.; XAVIER-FILHO, L.; PEREIRA, E. C. Flujo de nutrientes en comunidades de tundra Antártica. **Boletim Antártico Chileno**, v. 4: p. 82-84, 1984.

HALE JR. M. E. **The Biology of lichens**. 3ed. London Edward Arnold Pub., p. 90, 1983.

HALE, M. E. **The Biology of lichens**. 3ed. Edward Arnold, London, p.18 1874.

HARKSWORTH D. L. & HILL, D. J. **The Lichen Forming Fungi**. New York, Chapman & Hall, p. 158, 1984.

HILL, D. J. Etudiens on the growth of lichens. I. lobe formation and the maintenance of circulatory in crustose species. **Lichenologist**, v. 16, p. 273-278, 1984.

HUNECK, S; YOSHIMOURA, I. **Identification of lichen substances**. Berlin. Springer-verlag. p. 493, 1996.

INGOLFSDOTTIR, K.; HJALMARSDDOTTIR, M.; SIGURDSSON, A., GUDJONSDOTTIR, G.; BRYNJOLFSDOTTIR, A .; STEINGRIMSSON, O. *In vitro* susceptibility of *Helicobacter pylori* to protolichesterinic acid from the

lichen *Catrraria islandica*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 41, p. 215-217, 1997.

INOUE, T. & IWAIDA, M. On the utilization of usnic acid, a lichen substance. **Journal Society Cosmetology aud Chemical**. v.14, p. 57-61, 1980.

KORTENKANGAS, A . E.; VIRTANEN, O . E. The antibiotic activity of some amino compound derivatives of usnic acid. **Soumen Kemistilehti**, v. 19, p. 2-4, 1956.

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 Chemotherapy**, v. 39, p. 2541-2543, 1995.

LEGAZ, M. & VICENTE, C. Endogenous inactivadors of arginase, arginina descarboxilase and agmatine amdinohydrolase in *Everniaprunastr* thallus. **Plant Physioly**, v. 71, p. 300-302, 1983.

LEGAZ, M. E.; VICENTE, C.; ASCASO, C.; PEREIRA, E. C. & XAVIER – FILHO, L. Pigment analysis of sun and populations of *Cladonia verticillaris*. **Biochemical Systematics. Ecology**, v. 14, p. 575 – 582, 1986.

MAIA, M. B. S.; SILVA, N. H.; SILVA, E. F.; CATANHO, M. T. J.; SCHULER, A. R. P.; PEREIRA, E.C. Antinociceptive activity of crude extracts and

atranorin obtained from the lichen *Cladina dendroides* (des Abb.) Ahti. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 21(4), 2002.

MARGULIS, L.; SCHWARTZ, K. **Five Kingdoms**. San Francisco, w. h. Freeman and Company, p. 382, 1982.

MITCHEL, J. C.; ARMITAGE, J. S.; VARCOUVER. Dermatitis venerata from lichens. British Columbia. **Archives of Environmental Health**. v.11, p. 701 - 709, 1965.

NASH III, T. H. **Lichen Biology**. Cambridge, Cambridge University Press, p. 303, 1996.

PÄTIÄLÄ, J.; PÄTIÄLÄ, R. I –Usnic acid and observations on its effect in human tuberculosis. **Annales Medicinae Experimentales et Biologiae Fenniae**, v. 32, p. 3 - 22, 1954.

PEREIRA, E. C.; SILVA, N. H.; CAMPOS – TAKAKI, G. M.; XAVIER-FILHO, L.; LEGAZ, M. E.; VICENTE, C. Fractionation of *Cladonia substellata* crude extracts and detection of antimicrobial activity. **Boletim da Sociedade Broteriana**, v. 64, p. 173 –186, 1991.

PEREIRA, E. C.; SILVA, N. H.; CAMPOS –TAKAKI, G. M.; XAVIER-FILHO, L.; LEGAZ, M. E.; VICENTE, C. Antimicrobial activity of biologically active compounds from the lichen *Cladonia crispatula*. **Boletim Ecotropica**, v. 31, p. 10 - 19,1997.

PEREIRA, V. M. W. **Obtenção, Caracterização Físico – química e Atividade Antimicrobiana de Nanocápsulas de Penicilina G benzantina.**

Tese de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, 1996.

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

PUISIEUX, F. & REBLOT-TREUPPEL, L. Vectorization et vecteurs des médicaments. **S.T.P. Pharma**. v. 5, p.107-133, 1989.

RIBEIRO, S. M.; PEREIRA, E.C.; SILVA, N.H.; FALCÃO, E.P.; GUSMÃO, N.B.; HONDA, N. K; QUILOT, W. Detection of antibacterial activity of lichen substances trough microdilution tests. In: **S.Cavelo & T. Feverer, ed. Lichenology in latin America II. Hamburg**, p. 185 – 194, 2002.

RIBEIRO, S. M.; **Líquens como produtores de substâncias ativas contra microrganismo patogênicos.** Dissertação de Mestrado em Biologia Vegetal, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil, p. 63, 1999.

SANTOS MAGALHÃES, N. S.; FESSI, H.; PUISIEUX, F.; BENITA, S.; SEILLER, M. An *in vitro* release kinetic examination and comparative evaluation between submicron emulsion and polylactic acid nanocapsules of

clofibríde. **Journal of Microencapsulation**. v. 12, p. 211 - 226, 1995.

SANTOS, N. P.; NASCIMENTO, S. C.; PEREIRA, E. C.; SILVA, N. H.; HONDA, N. K.; FIGUEREDO-SILVA, J. and SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Cytotoxicity and antitumoral activity of PLGA-nanocapsules containing usnic acid. **Drug Delivery Systems**, p. 117-118, 2001.

SANTOS, N. P.; PEREIRA, E. C.; SILVA, N. H.; HONDA, N. K.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Encapsulation of usnic acid into PLGA- nanocapsules. *Int. J. Pharm.* (submitted,2002).

SANTOS-MAGALHÃES, N. S., SOUSA, A. O; SANTOS, N. P.; PEREIRA, E. C.; SILVA, N. H.; Antimicrobial activity of usnic acid encapsulated into PLGA- nanocapsules. **Antimicrob. Agents Chemotherapy** (submitted,2002).

SANTOS-MAGALHÃES, N. S.,PONTES, A.; PEREIRA, V.H.W.; CAETANO, M.N.P. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules **Int. J. Pharm.** 208: 71-80, 2000.

SEAWARD, M. R. D. **Lichen Ecology**. London, Academic Press, p. 550, 1977.

THOMSON, J. W. **The Lichen Genus Cladonia in North America**, Canada University of Toronto Press, p. 172, 1967.

VARTIA, K. O. & TERVILA, L. D –Lichesteric acid, effect *in vivo* on pigmented mice with inoculation tuberculosis. **Annales Medicinae Experimentalis et Biologica Fenniae**, Helsinki, v. 1, p. 76 –78, 1952.

VICENTE, C. & XAVIER-FILHO, L. – Estúdio biológico e farmacológico de los antibióticos de origen liquenico. *IN*: II Simpósio Nacional de Farmacologia e Química de Produtos naturais. João Pessoa. **Anais do 2 SINPRONAT**, : UFPB, LTF, p. 319-343, 1983.

VICENTE, C; PEREIRA, M. T.; PEDROSA, M.M.; SOLAS, T. M.; PEREIRA, E. C. *In*: Flechten Follmann contribution to lichenology in honour of Gerhard follmann. J. A. Daniels, M. S. Schulz, J. Peine (Eds). The geobotanical and phytotaxonomical study group, **Botanical Institute**, University of Cologne, Germany, p. 97-110, 1995.

YANO, A. M. Atividade biológica de *Cladonia verticillaris* e *Cladonia substellata* sobre a germinação e desenvolvimento da plântula de *Allium cepa*. Dissertação de Mestrado em Criptógamos/ UFPE, p.126, 1994.

**5- Trabalho a ser submetido para publicação na acta
farmaceutica bonaerense**

**ESTUDO COMPARATIVO DA ATIVIDADE
ANTIESTAFILOCÓCICA DO ÁCIDO ÚSNICO COM
SUA FORMA NANOCAPSULADA**

DUARTE, B. R.; SANTOS, N. P.; SILVA, N. H.; PEREIRA, E. C.; SANTOS-
MAGALHÃES, N. S & AZEVEDO-XIMENES, E.

ESTUDO COMPARATIVO DA ATIVIDADE ANTIESTAFILOCÓCICA DO ÁCIDO ÚSNICO LIVRE COM SUA FORMA NANOCAPSULADA

DUARTE, B. R.^{1,2} ; SANTOS, N. P.^{1,2} ; SILVA, N. H.¹; PEREIRA, E. C.³ ;
SANTOS-MAGALHÃES, N. S.^{1,2} & AZEVEDO-XIMENES, E.⁴ .

1. Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco;
2. Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco;
3. Departamento de Ciências Geográficas da Universidade Federal de Pernambuco;
4. Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco - Brasil

RESUMO

Os líquens produzem várias substâncias antibióticas dentre elas o ácido úsnico, cuja atividade antimicrobiana fora demonstrada sobre vários microrganismos principalmente bactérias Gram-positivas e bacilos álcool-ácido-resistentes. Com a finalidade de avaliar esta atividade antimicrobiana, o ácido úsnico foi extraído da *Cladonia substellata* Vainio purificado,

caracterizado e testado frente a isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*. A atividade antiestafilocócica do ácido úsnico foi determinada pela Concentração Mínima Inibitória (CMI) através do método de difusão em meio sólido sobre dez cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de espécimes humanos e uma de coleção ATCC. Neste estudo também foram determinadas as CMIs para o ácido úsnico padrão (Merck) e para a sua forma nanoencapsulada. A partir de soluções padronizadas em 50µg/ml do ácido úsnico, foram realizadas diluições seriadas de modo a obter no final placas contendo concentrações de 50 a 7µg/ml. Estas placas foram semeadas com um inóculo padronizado de 10⁸UFC/ml dos microrganismos teste. Todas as formas do ácido úsnico mostraram-se ativas frente as cepas de *Staphylococcus aureus* testados. As concentrações mínimas inibitórias situaram-se entre 50µg/ml e <7µg/ml, e foram dependentes da forma do ácido úsnico, e das cepas de *Staphylococcus aureus* utilizadas no estudo.

INTRODUÇÃO

O interesse por novas substâncias antibióticas é amplamente justificado face à incidência cada vez maior da multiresistência microbiana induzida principalmente pelo uso inadequado desses medicamentos.

Metabólitos secundários e extratos brutos de líquens, principalmente o ácido úsnico, estão sendo estudados por diversos pesquisadores (Vartia et al., 1974, Richardson, 1975, 1988, 1991; Rundel 1978; Lawrey 1984, 1986, 1989).

As primeiras investigações acerca da atividade antimicrobiana dos líquens foram reportadas por Burkholder e colaboradores (1944). Vários outros pesquisadores estudando extratos brutos de vários gêneros de líquens obtiveram uma atividade direcionada para bactérias Gram-positivas e bacilos álcool-ácido resistentes (Bustinza, 1951; Capriotti, 1961; Xavier-Filho *et al.*, 1976).

A atividade antimicrobiana do ácido úsnico foi determinada no início dos anos 50. É difícil comparar estes primeiros resultados com os mais recentes que utilizam métodos mais sensíveis e padrões de referência (Cochietto *et al.*, 2002). Alguns trabalhos mais recentes confirmaram a atividade antibiótica do ácido úsnico contra *S. mutans* (Glione *et al.*, 1988, 1985; De Paola *et al.*, 1974). Um estudo clínico foi realizado em voluntários utilizando o ácido úsnico por via oral como preventivo na formação de placas bacterianas e cáries (Grasso *et al.*, 1989). O ácido úsnico em uma preparação contendo sulfato de zinco foi submetido a ensaios clínicos para tratamento pós-cirúrgico de lesões genitais causadas por infecção com o vírus *Pappiloma* humano – HPV (Scirpa *et al.*, 1999).

Em estudos pioneiros, Pereira e colaboradores (1991, 1996, 1997) detectaram a atividade antimicrobiana de extratos brutos de *Cladonia substellata*, *C. coralifera* e *C. crispatula*, e relacionou esta atividade a presença de ácido úsnico, o qual fora isolado e caracterizado.

Baseado no potencial antimicrobiano do ácido úsnico descrito na literatura, o presente trabalho objetivou a determinação da concentração mínima inibitória (MIC) do ácido úsnico isolado de *C. substellata* e de sua forma nanocapsulada comparando-a àquela do ácido úsnico sintético,

utilizado como padrão.

MATERIAIS E MÉTODOS

Extração e identificação do ácido úsnico

O ácido úsnico foi isolado e purificado de *Cladonia substellata* Vainio coletado por Sheila Ribeiro em vegetação de terra firme do tipo campina em Acará, Campina do Guajará, Pará em 1998 e identificado por Marcelo Marcelli. Uma amostra deste líquen encontra-se depositada no herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) sob o n° 28292.

Para a extração e o isolamento do ácido úsnico foi utilizada a metodologia descrita por Asahina & Shibata (1954) modificada por Pereira (1998). O ácido úsnico purificado consiste em cristais de coloração amarela, cujo rendimento foi de 98% de pureza.

Microrganismos

Para a realização dos testes foram selecionados dez isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* do Laboratório da Prefeitura Central do Recife-PE IC 155, 247, 149, 404, 138, 139, 133, 159, 311, 401 e uma cepa de coleção (ATCC 6538), cujo perfil de resistência após a realização do antibiograma está apresentado na tabela 2

Obtenção de nanocápsulas de PLGA contendo ácido úsnico

Nanocápsulas de copolímero de ácido d,l-lático e glicólico (PLGA

50/50) contendo ácido úsnico foram previamente obtidas por Santos e colaboradores (2002), segundo o método de deposição interfacial de polímero pré-formado (Fessi *et al.*, 1989). O princípio do método consiste na deposição de um polímero pré-formado biodegradável, na superfície das vesículas por deslocamento para a fase aquosa do solvente semipolar, no qual o polímero encontra-se inicialmente dissolvido na fase orgânica.

Os constituintes da fase orgânica PLGA (Birmingham, USA), fosfolípido de soja (Epikuron 200, Lucas Meyer, Alemanha), óleo de girassol purificado (SIGMA, USA) e o ácido úsnico purificado foram separadamente dissolvidos em acetona (50 ml), sendo o Epikuron mantido sob aquecimento a 40°C durante a solubilização. As soluções cetônicas foram, então, misturadas resultando na fase orgânica final. Esta fase, foi lentamente introduzida à fase aquosa constituída de tampão fosfato pH 7,4 (50ml) e do tensoativo hidrofílico (polaxamer), sob agitação magnética moderada (100 rpm) à temperatura de 25⁰ ± 1⁰C. A fase aquosa imediatamente adquiriu um aspecto branco-leitoso, com reflexo azul-opalescente resultante da formação das nanocápsulas.

Durante o processo de formação das nanocápsulas a acetona é rapidamente difundida na fase aquosa, podendo ser removida facilmente sob pressão reduzida a 40°C. A suspensão coloidal foi concentrada para um volume final de 10 ml, por evaporação da água sob as mesmas condições de evaporação do solvente orgânico.

Preparação das diluições do ácido úsnico

O ácido úsnico padrão (Merck) e o ácido úsnico purificado da C.

substellata foram pesados e dissolvidos em acetona de forma a obter soluções estoque (padrão e teste) de concentração equivalente a 500 µg/ml. Uma série de diluições utilizando água destilada esterilizada foi preparada, cujas concentrações de ácido úsnico variaram de 70 a 500 µg/ml.

A suspensão de nanocápsulas contendo ácido úsnico a 1mg/ml foi diluída em solução esterilizada de tampão fosfato 0,1M (pH 7,4) de modo a obter suspensões diluídas em concentrações que variaram também de 70 a 500 µg/ml.

Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)

A Concentração Mínima Inibitória (CMI) do ácido úsnico foi determinada pelo método de diluição em meio sólido descrito por Courvalin e colaboradores (1985).

Culturas dos microrganismos teste, incubadas por 18 horas em meio líquido de Mueller-Hinton, foram diluídas em novo meio de modo a obter uma turbidez equivalente ao tubo 0,5 da escala de Mac Farland, o que equivale a 10⁸ UFC/ml.

As Placas de Petri foram preparadas pela adição de uma parte de cada uma das diluições do ácido úsnico e 9 partes de meio sólido de Mueller-Hinton. Placas contendo meio de cultura com acetona na mesma concentração utilizada na preparação das diluições (padrão e teste) foram incluídas para o controle de uma possível atividade intrínseca. Após 72 h de incubação para uma pré-difusão do ácido úsnico, as placas foram semeadas com *swabs* e incubadas por 18 horas a 37⁰C. A Concentração Mínima Inibitória foi definida como a menor concentração da droga na qual

não foi observado crescimento visível de microrganismos. Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados em duplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados para a CMI do ácido úsnico padrão, purificado de *Cladonia substelata* e encapsulado em nanocápsulas de PLGA estão apresentados na tabela 1.

Os dados obtidos mostram que o ácido úsnico apresentou atividade sobre todas as cepas de *S. aureus* testadas, com valores de CMI entre 15 e 30 µg/ml ou inferiores a 7 µg/ml, com exceção da forma nanocapsulada que variou de 25 a 50 µg/ml. Os resultados da CMI foram dependentes da cepa do microrganismo ou da forma do ácido úsnico utilizada.

As cepas de *S. aureus* mais sensíveis ao ácido úsnico padrão e purificado foram IC 139, 401, 149, 247 e 133 com valores de CMI variando de < 7 a 30 µg/ml, sendo que a cepa resistente IC 139 apresentou uma sensibilidade 50 % superior àquela da cepa padrão ATCC 6538, com exceção da forma nanoencapsulada do ácido úsnico.

Os resultados da atividade antimicrobiana do ácido úsnico purificado de *C. substellata* obtidos no presente trabalho corroboram àqueles anteriormente descritos pelo Grupo de Estudo dos Líquens da UFPE (Pereira *et al.*, 1999, Ribeiro *et al.*, 2002, Xavier-Filho *et al.*, 1976).

Os resultados aqui obtidos estão também de acordo com aqueles reportados por Lauterwein e colaboradores (1995). Esses autores determinaram valores de CMI de 4 a 16 µg/ml do ácido úsnico sobre isolados clínicos *S. aureus* susceptíveis (MSSA) e resistentes (MRSA) a

metilina, utilizando o método de micro-diluição em meio líquido.

As cepas mais sensíveis à forma nanoencapsulada do ácido úsnico foram *S. aureus* IC 133 e IC 401 com valores de CMI de 25 µg/ml, contrariamente a todas as outras cepas estudadas, cujos valores de CMI foram de 50 µg/ml.

Os valores da CMI para o ácido úsnico nanoencapsulado foram bem superior àqueles obtidos com o ácido úsnico padrão e purificado. Estes resultados podem ser explicados pelo fato de que *in vitro* deve ocorrer inicialmente a difusão do ácido úsnico do interior das nanocápsulas para o meio externo (meio de cultivo) e que somente após sua liberação, o mesmo pode afetar o crescimento microbiano. Possivelmente, o meio de cultura sólido dificultaria a difusão do ácido úsnico a partir das nanocápsulas.

Fontana e colaboradores (1998) relatam a atividade antimicrobiana de ampicilina encapsulada em nanopartículas de polietilenoacrilato, frente a cepas de coleção (ATCC) de *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis* e *S. epidermidis*. O método utilizado para determinação da CMI foi o de micro diluição em meio líquido, sendo obtido resultados de CMI para a forma nanoencapsulada de ampicilina igual ou inferior àquela da ampicilina em solução.

O método de difusão em meio sólido, utilizando discos de papel impregnados com 10 µl de nanocápsulas de PLGA contendo penicilina G benzatina (PenGB) a 1mg/ml, foi utilizado para a determinação da atividade antimicrobiana contra *Streptococcus pyogenes* (Santos-Magalhães *et al.*, 2000). Após 18 h de incubação foram obtidos halos de inibição similares para a PenGB padrão (em solução) e teste (nanoencapsulada). Os

resultados demonstraram que a PenGB nanoencapsulada inibiu 100% de crescimento do *S. pyogenes*.

Recentemente, a atividade antimicrobiana do ácido úsnico incorporado em nanocápsulas de PLGA contra *Mycobacterium tuberculosis*, foi determinada cuja CMI foi de 30 µg/ml (Santos-Magalhães *et al.*, 2002). Esta atividade foi ainda mais pronunciada quando o *M. tuberculosis* foi previamente incubado com macrófagos, promovendo uma diminuição do crescimento microbiano de 25% com relação a uma solução padrão de rifampicina (fármaco de referência contra o *M. tuberculosis*).

Em conclusão, o ácido úsnico purificado ou nanoencapsulado apresentou atividade frente a cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes, com concentrações mínimas inibitórias entre 50µg/ml e <7µg/ml, dependentes da forma do ácido úsnico e das cepas de *S. aureus* utilizadas no estudo.

Tabela 1. Concentração Mínima Inibitória (CMI) do ácido úsnico de *Cladonia substellata* na forma livre (solução) e nanocapsulada frente a cepas resistentes de *Staphylococcus aureus*.

MICROORGANISMO	CMI µg/ml*	ÁCIDO ÚSNICO
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	15	Padrão*
	15	Purificado**
	50	Nanoencapsulado***
<i>S. aureus</i> IC155	30	Padrão
	30	Purificado
	50	Nanoencapsulado
<i>S. aureus</i> IC247	15	Padrão
	15	Purificado
	50	Nanoencapsulado
<i>S. aureus</i> IC149	<07	Padrão
	15	Purificado
	50	Nanoencapsulado
<i>S. aureus</i> IC404	15	Padrão
	30	Purificado
	50	Nanoencapsulado
<i>S. aureus</i> IC138	15	Padrão
	07	Purificado
	50	Nanoencapsulado
<i>S. aureus</i> IC139	07	Padrão
	07	Purificado
	50	Nanoencapsulado
<i>S. aureus</i> IC133	15	Padrão
	15	Purificado
	25	Nanoencapsulado
<i>S. aureus</i> IC159	15	Padrão
	30	Purificado
	50	Nanoencapsulado
<i>S. aureus</i> IC311	30	Padrão
	30	Purificado
	50	Nanoencapsulado
<i>S. aureus</i> IC401	15	Padrão
	<07	Purificado
	25	Nanoencapsulado

* Ácido úsnico (merck); ** Ácido úsnico purificado de *C. substellata*; ***Ácido úsnico purificado de *C. substellata* encapsulado em nanocápsulas de PLGA.

Tabela 2. Origem das cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de vários espécimes humanos e seu perfil de resistência aos vários antibióticos.

Microrganismos	Origem dos espécimes	Resistência a:
<i>S. aureus</i> 133	Secreção vaginal	Eritromicina, sulfa,ampicilina, amicacina , cloranfenicol
<i>S. aureus</i> 138	Secreção vaginal	Eritromicina, sulfa,ampicilina, amicacina , cloranfenicol, cefalotina
<i>S. aureus</i> 139	Lesão de pele	Eritromicina, sulfa,ampicilina, rifampicina, cloranfenicol, cefalotina
<i>S. aureus</i> 149	Secreção vaginal	Eritromicina, sulfa,ampicilina, amicacina , cloranfenicol,
<i>S. aureus</i> 155	Secreção vaginal	Eritromicina, sulfa, cefalotina gentamicina , cloranfenicol,
<i>S. aureus</i> 159	Secreção vaginal	Eritromicina, sulfa,ampicilina, amicacina , cloranfenicol
<i>S. aureus</i> 247	Lesões das fossas nasais	Eritromicina, sulfa,ampicilina, cloranfenicol
<i>S. aureus</i> 311	Lesão na pele (dedo)	Amicacina, penicilina , cloranfenicol, getamicina , sulfa
<i>S. aureus</i> 401	Secreção da orofaringe	Eritromicina, sulfa,ampicilina, getamicina, rifampicina cloranfenicol
<i>S. aureus</i> 404	Secreção da orofaringe	Eritromicina, sulfa,ampicilina, gentamicina, rifampicina cloranfenicol

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASAHINA, Y.; SHIBATA, S. **Chemistry of Lichen Substance**, Tokio, Japanese Society for the Promotion of Science, 240p., 1954.

BURKLOLDER, P. R.; EVANS, A. W.; MACVEIGH, I.; THORNTON, H. R. Antibiotic activity of lichens. **Proceedings National Academy Sciences**, 30: 250-255, 1944.

BUSTINZA, F. Contribución al estudio de las propiedades antibacterianas y antifungicas del acido usnico e algunos de sus derivados. **Annales del Instituto Botanico de A. J. Cavanilles**, 10:157-175, 1951.

CAPRIOTTI, A. The effect of Usno on yeast isolated from the excretion of tuberculosis patients. **Antibiotic Chemotherapy**, v.11, p. 409 – 410, 1961.

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

DE PAOLA PF, JORDAN HV, BERG J. Temporary suppression of *Streptococcus mutans* in humans Trough topical application of van comycin.

J Den Res V.53, 108-114, 1974.

FONTANA, G.; PITARRESE, G.; TOMARCHIO, V.; CARLISI, B.; BIAGIO, P. L. S. Preparation, characterization and in vitro antimicrobial activity of ampicilin-loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles. *Biomaterials* 19: p. 1009-1017. 1998.

GLIONE, M.; PARELLO, D.; GRASSO, L. Usnic acid revisited, its activity on oral flora. **Chemioterapia** v.7 302-305,1988.

GRASSO, L.; GHIRARDI, P. E.; GHIONE, M Usnic acid, a selective antimicrobial agent against *Streptococcus mutans*: a pilot clinical study. *Curr Ther Res* V. 45.1067-1070,1989.

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 Chemotherapy**, 39, 2541-2543, 1995.

LAWREY, J. D. Lichen secondary compounds: evidence for a correspondence between antíherbivore and antimicrobial function. *Bryologist* 92;326-328, 1989.

PEREIRA, E. C. (1998) Produção de metabólitos por espécies de

Cladoniaceae, a partir de imobilização celular. Tese de Doutorado, UFRPE. 240 p.

PEREIRA, E. C.; SILVA, N. H.; CAMPOS – TAKAKI, G. M.; XAVIER-FILHO, L.; LEGAZ, M. E.; VICENTE, C. Fractionation of *Cladonia substellata* crude extracts and detection of antimicrobial activity. **Boletim da Sociedade Broteriana**, 64: 173 –186, 1991.

PEREIRA, E. C.; SILVA, N. H.; BRITO, E.S.; CRUZ, J.; SILVA, M. I. Atividade antimicrobiana de líquens amazônicos I: *Cladonia corallifera* e *Cladonia ubstellata*. **Revista da Universidade do Amazonas, Série Ciências Biológicas**, 1:65 –77, 1996.

PEREIRA, E. C.; SILVA, N. H.; CAMPOS –TAKAKI, G. M.; XAVIER-FILHO, L.; LEGAZ, M. E.; VICENTE, C. Antimicrobial activity of biologically active compounds from the lichen *Cladonia crispatula*. **Boletim Ecotropica**, 31 10 –1997.

RIBEIRO, S. M.; PEREIRA, E.C.; SILVA,N.H.; FALCÃO, E.P.; GUSMÃO, N.B.; HONDA, N. K; QUILOT, W. Detection of antibacterial activity of lichen substances trough microdilution tests. In: **S.Cavelo & T. Feverer, ed. Lichenology in latin America II.Hamburg**, p.185 – 194, 2004.

RICHARDSON, D.H.S. The vanishing Lichens: their history. Biology and Importance. Newton Abbot: & Charles., 1975.

RICHARDSON, D.H.S. Medicinal and other economic aspects of lichens. In CRC Handbook of Lichenology Vol.3. (M. Galun, ed): 93-108. Boca Raton: CRC Press,1988.

Richardson,D.H.S. Lichens and man. In *Frontiers in Mycology*. (D.L. Hawksworth. Ed.): 187-210. Wallingford: CAB International, 1991.

Rundel, P. W. The ecological role of secondary lichen substances. *Biochemical systematics and ecology*, 1978.6:157-170,1978.

Sciences, 30: 250-255.

SANTOS, N. P.; NASCIMENTO, S. C.; PEREIRA, E. C.; SILVA, N. H.; HONDA, N. K.; FIGUEREDO-SILVA, J. and SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Cytotoxicity and antitumoral activity of PLGA-nanocapsules containing usnic acid. **Drug Delivery Systems**, p. 117-118, 2001.

SANTOS, N. P.; PEREIRA, E. C.; SILVA, N. H.; HONDA, N. K.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Encapsulation of usnic acid into PLGA- nanocapsules. *Int. J. Pharm.* (submitted,2002).

SANTOS-MAGALHÃES, N. S., SOUSA, A. O; SANTOS, N. P.; PEREIRA, E. C.; SILVA, N. H.; Antimicrobial activity of usnic acid encapsulated into PLGA- nanocapsules. **Antimicrob. Agents Chemotherapy** (submitted,2002).

SANTOS-MAGALHÃES, N. S., PONTES, A.; PEREIRA, V.H.W.; CAETANO, M.N.P. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules **Int. J. Pharm.** 208: 71-80, 2000.

Vartia, K. O. & Tervila, L. D –Lichesteric acid, effect in vivo on pigmented mice with inoculation tuberculosis. **Ann. Med. Exp. Fenn.**, Helsinki, v. 1, p. 76 –78, 1974.

XAVIER-FILHO, L., RIZZINI, C. T. **Manual de Liquefnologia Brasileiro**. Recife, Universidade Federal de Pernambuco, 431p, 1976.

6. CONCLUSÕES

A análise dos resultados da atividade antimicrobiana de ácido úsnico extraído e purificado de *C. substellata* na sua forma livre em solução ou nanocapsulado em nanocápsulas de PLGA comparado com o ácido úsnico padrão (sintético), sobre cepas resistentes de *S. aureus* obtidos de isolados clínicos de espécimes humanos, permite elaborar as seguintes conclusões:

- O ácido úsnico apresentou atividade antimicrobiana com CMI's variando de < 7 a 30 µg/ml dependendo da sensibilidade da cepa de *S. aureus* utilizada no ensaio.
- A forma nanoencapsulada do ácido úsnico apresentou CMI superior àquela da forma livre variando de 25 a 50 µg/ml. O tempo de incubação de 72h provavelmente seja insuficiente para a liberação completa do ácido úsnico a partir das nanocápsulas de PLGA; o que justificaria uma CMI alta.
- Os resultados obtidos neste estudo foram coerentes com aqueles descritos na literatura para o ácido úsnico obtido de diferentes espécies de Líquens, considerando a variabilidade dependente dos microrganismos e condições dos ensaios da atividade antimicrobiana.