

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM BIOQUIMICA E FISILOGIA

BRUNA MARIA PEREIRA DA COSTA CORDEIRO

ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS EXTRATOS ORGÂNICOS E DO ÁCIDO
DIFUMARÍCO PURIFICADO EXTRAÍDO DO LIQUEN *Ramalina aspera* FRENTE
LINHAGENS DE *Enterococcus sp.* E *Staphylococcus aureus oxacilina-resistente*

RECIFE

2014

BRUNA MARIA PEREIRA DA COSTA CORDEIRO

ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS EXTRATOS ORGANICOS E DO ÁCIDO
DIVARICÁTICO PURIFICADO EXTRAIDODO LIQUEN *Ramalina aspera* FRENTE
LINHAGENS DE *Enterococcus sp.* E *Staphylococcus aureus oxacilina-resistente*

Dissertação apresentado como requisitos para o
cumprimento das exigências para a obtenção do
título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia
pela Universidade Federal de Pernambuco.

ORIENTADOR: PROF^o. DR^o. NICÁCIO HENRIQUE DA SILVA
CO-ORIENTADORA: PROF^a. DR^o NORMA BUARQUE DE GUSMÃO

RECIFE

2014

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Cordeiro, Bruna Maria Pereira da Costa
Atividade biológica dos extratos orgânicos e do ácido divaricático extraído do líquen *Ramalina áspera* frente linhagens de *Enterococcus* sp. e *Staphylococcus aureus* oxacilina-resistente./ Recife: O Autor, 2014.

62 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Nicácio Henrique da Silva

Coorientadora: Norma Buarque de Gusmão

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de

Pernambuco. Centro de Biociências. Bioquímica e Fisiologia,

2014.

Inclui referências e anexo

1. Antibióticos 2. Bactérias 3. Produtos naturais I. Silva, Nicácio Henrique da (orient.) II. Gusmão, Norma Buarque de (coorient.) III. Título

615.329

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017- 507

BRUNA MARIA PEREIRA DA COSTA CORDEIRO

ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS EXTRATOS ORGANICOS E DO ÁCIDODIVARICÁTICO
PURIFICADO EXTRAÍDO DO LIQUEN *Ramalina aspera* FRENTELINHAGENS DE
Enterococcus sp. E *Staphylococcus aureus oxacilina-resistente*

Dissertação apresentado como requisitos para o cumprimento das exigências para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Banca Examinadora

Prof^o. Dr^o Nicácio Henrique da Silva (PRESIDENTE)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dr^a Vera Lucia de Menezes Lima (Interno 2)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o Dr^o Emerson Peter da Silva Falcão (Externo 1)

Centro Acadêmico de Vitória (UFPE)

Prof.^a Dr^a Leonor Alves de Oliveira da Silva (Externo 2)

Departamento de Antibióticos (UFPE)

DATA: 25/02/2014

Dedico este trabalho a meu pai (*in memoriam*)
sei que de onde estiver torceu por mim. A
minha mãe Sônia, quem me ensinou a nunca desistir de
meus sonhos, minha Vó Jonianha, as
minhas irmãs Aletta e Flávia, meu irmão Jorge, em
e meu cunhado Theo que sempre me deram o apoio que
precisei para concluir o mestrado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e ao meu guia espiritual por sempre iluminarem os meus caminhos, e por sempre atenderem as minhas preces.

Agradeço a minha mãe por sempre acreditar em mim, por estar ao meu lado me apoiando e me acalmando para que eu pudesse continuar e não desistir dos meus objetivos, mãe és o meu exemplo de coragem, força, determinação, e minha inspiração para não desistir nunca diante de momentos difíceis.

As minhas irmãs Aletah e Flavia, meu irmão Jorge, e meu cunhado Theo e Fabio por toda amizade, por todo apoio, por todas as palavras de incentivo, e por acreditarem no meu potencial, e me desculpem por todo o estresse.

As minhas Tias Neta, Zeze, Lindinalva, Helena, Marly e aos meus Tio Coca, e Bill por sempre torcerem por mim, e por todas as orações feitas direcionadas a mim.

As minhas amigas Helida, Tatalina, Clara, Taiana, Luciana, Denise, Aline, Danielle, Lu e Aninha, ao meu amigo Eric e Trigueiro, e aos meus primos Josenildo e Roberto que torceram, e compreenderam minha ausência e meus estresses, amo todos e agradeço todo carinho e amizade por mim.

Ao meu orientador Prof^o. Dr^o. Nicácio Henrique da Silva por todo apoio e ensinamento, tudo foi de grande importância para meu amadurecimento como pessoa e pesquisadora, levarei por toda a minha vida, e tomarei como exemplo o profissional e pessoa que o senhor é.

A minha co-orientadora Prof^a. Dr^a. Norma Buarque de Gusmão, por me ensinar tudo que precisei, por confiar em meu trabalho, por sua amizade e seu otimismo me dizendo que tudo ia dá certo, e deu tudo certo. Tudo que sei de microbiologia aprendi com a senhora.

A Prof^a Kêsia Xisto Fonseca Ribeiro de Sena, com toda sua calma e paciência me ajudou quando mais precisei, agradeço de todo o meu coração.

Ao Prof^o. Dr^o Emerson Peter da Silva Falcão por sempre confiar no meu potencial e não desistir de mim, por ser um amigo e sempre me aconselhando, obrigada por estar em minha vida acadêmica sempre.

Ao Dr^o. Ronaldo Zucatelli Mendonça por me receber com muita simpática em seu laboratório colaborando para realização deste trabalho.

Prof.^a. Dr^a Leonor Alves de Oliveira da Silva por toda simpatia e por me receber em seu laboratório colaborando com este trabalho.

A Dr^a Monica Martins por sua amizade, carinho, paciência, palavras de consolo e colaboração durante minha vida acadêmica.

Ao Sr^o João Virginio (Seu Joao), por ser meu anjinho, por acompanhar tudo o que eu estava fazendo no laboratório, me ensinando toda a parte técnica, e sempre me levantando quando caia, não tenho palavras pra agradecer tudo o que o senhor fez por mim.

A Prof^a. Dr^a Eugenia Cristina Pereira por me receber em seu grupo de Liquenologia. Aos meus amigos da turma de mestrado e do Laboratório de Química de Produtos Naturais Cleopatra, Thiago por todo apoio, e boas risadas durante os experimentos. Ao meu amigo Brunão por sempre está presente na minha vida, as minhas amigas Joelma, Lourdes, Alessandra, Tamires, Clarissa, Pamela e Alexandre do Laboratório de Química de Produtos Naturais pela torcida .

Aos meus amigos da turma de mestrado Carolina, Milena, Amanda, Amália, Adelmo, Laís e Cibele pela companhia maravilhosa nas horas do almoço e nas aulas, vocês moram no meu coração.

Aos meus amigos do LAMAI, Pérsio, Flavia, Robson, Luis Claudio, Erik, Glêzia, Raul, Diana, Maria Claudia, Nelânia, Evelyne, Luis Neto, Emmanuelle, Rafael, Tiago, Helena, Maira e minha aluna-amiga de iniciação científica Nizza, pelas conversas extremamente científicas, pelas boas risadas, por todo apoio, por estarem do meu lado me dando força, equilíbrio e carinho que foram essenciais e de onde tirei energia para realizarem este trabalho.

Aos meus amigos Juliana, Taisy, Marina, Guilherme, Mariana, Dalton, Natalia Isola, Juliane, Felipe, e Nathalia Delazeri do Laboratório de Malacologia do Instituto Butantan, a Sr^a. Shirlei e Raphael que me receberam com todo carinho e por me acolherem no ciclo de amizade.

As divas Nathale, Mayra, Marília, Camila, Luiza, Verbenia, Ana Karla, Ana Lidia por todos os momentos de diversão e pela torcida para tudo dá certo.

A CAPES pelo apoio financeiro durante estes dois anos de mestrado.

E todas as pessoas que participaram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho que porventura tenha esquecido de citar.

“Acenda a luz da esperança. Se a dificuldade lhe aperta e os problemas aparecem sem solução, procure acender a luz da esperança. Não fraqueje. Tudo tem solução. Basta querer e esforçar-se. Você tem capacidade. Lute. Creia em si mesmo. Uma forte luz está colocada por Deus dentro de você. Ame. Você está acendendo a luz da esperança quando passa acreditar que Deus não desampara a ninguém”.

(Lourival Lopes, do livro: Sementes da felicidade)

RESUMO

Os microrganismos patógenos vêm desenvolvendo resistência aos medicamentos disponíveis para o tratamento de diferentes infecções, o que tem sido uma constante preocupação entre os médicos. Por esta razão, as pesquisas em busca de novos compostos químicos com atividade antimicrobiana tem sido crescente. Neste sentido, os líquens se mostram como uma excelente fonte de compostos bioativos com diversos relatos já descritos na literatura. Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana e antiviral de extratos de *Ramalina aspera*; e do ácido divaricático purificado, seu composto majoritário, em sinergismo com outras drogas. O extrato etéreo, clorofórmio e acetônico foram obtidos utilizando 35 g de líquen, seco em temperatura ambiente e mantidos em dessecador. O ácido divaricático purificado (ACDP) obtido de *R. aspera* foi isolado a partir do extrato etéreo e identificado através de cromatografia em camada delgada, sendo sua estrutura química confirmada através de RMN H^1 , RMN C^{13} e infravermelho. Os ensaios antimicrobianos foram realizados através do teste de difusão em meio sólido, utilizando os extratos orgânicos frente às bactérias *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enteridis*, *Micrococcus luteus* e *Staphylococcus aureus*. Com o extrato etéreo e ACDP foram realizados testes de CMI com *S. aureus* (cepas padrão UFPEDA 01 e 10 linhagens de isolados clínicos de oxacilina- resistente/ORSA) e *Enterococcus faecalis* (cepas padrão UFPEDA 138 e 5 linhagens de isolados clínicos). Para os testes de sinergismo verificou-se a ação do ACDP em associação com os antibióticos oxacilina, eritromicina, levofloxacino, e clindamicina nas proporções 7:3 (v/v) e 5:5 (v/v), onde totalizou uma concentração inicial de 128 $\mu\text{g/mL}$. Em adição foi verificado também a atividade antiviral do ácido divaricático sobre os vírus Influenza H1N1 e sarampo. Os testes de difusão em meio sólido mostraram que o extrato etéreo foi o mais ativo frente às bactérias: *B. subtilis* (25 mm), *S. aureus* (17 mm), enquanto o extrato acetônico foi mais ativo para *K. pneumoniae* (9 mm), o extrato clorofórmico não apresentou resultados significativos. Os valores de CMI do extrato etéreo foram de 40 $\mu\text{g/mL}$ (*B. subtilis*) e de 320 $\mu\text{g/mL}$ (*S. aureus*), enquanto que a CMI do ACDP a 32 $\mu\text{g/mL}$ para os ORSA UFPEDA 728 e UFPEDA 726, e uma CMI de 8 $\mu\text{g/mL}$ para os *Enterococcus* spp. UFPEDA 854 e UFPEDA 847. Nos ensaios de atividade sinérgica, só houve sinergismo na associação do ACDP com o levofloxacino nas duas proporções para os ORSA (UFPEDA 728 e UFPEDA) 726. Para o *E. faecalis* (UFPEDA 138) houve sinergismo na proporção 7:3 (v/v) com o mesmo antibiótico. O ACDP apresentou forte atividade antiviral protegendo a célula 64 vezes e 32, respectivamente da infecção viral. Conclui-se que o ácido divaricático purificado é um novo modelo de fármaco natural para o tratamento de patologias causadas por vírus e bactérias.

Palavras-Chave: Ácido divaricático. Atividade antibacteriana. Atividade antiviral. Produtos naturais. Sinergismo.

ABSTRACT

Microorganism pathogens are developing resistance to available drugs for the treatment of various infections, which has been a constant concern among doctors. For this reason, research in search of new chemical compounds with antimicrobial activity has been increasing. In this sense, the lichens are shown as an excellent source of bioactive compounds with several reports described in the literature. Therefore, this study aimed to evaluate the antibacterial and antiviral activity of extracts of *Ramalina aspera*; and purified divaricatic acid, its major compound in synergy with other drugs. The ethereal chloroform and acetone extracts were obtained using 35 g of lichen, dried at room temperature and kept in a desiccator. The purified divaricatic acid (ACDP) obtained from *R. aspera* was isolated from the ether extract and identified by thin layer chromatography, and its chemical structure confirmed by RMN H^1 , RMN C^{13} and infrared. Antimicrobial assays were performed using diffusion test on solid medium, using organic extracts from the bacteria *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enteridis*, *Micrococcus luteus* and *Staphylococcus aureus*. The test of the CMI ether extract and the ACDP was conducted with species of *S. aureus* (UFPEDA 01 standard strains and 10 clinical strains isolated from oxacillin-resistant/ORSA) and *Enterococcus faecalis* (UFPEDA 138 standard strains and 5 clinical isolated) were performed. For the synergism tests verified the ACDP actions in combination with antibiotics oxacillin, erythromycin, levofloxacin, and clindamycin antibiotics at 7:3 (v/v) to 5:5 (v/v), which amounted to an initial concentration of 128 $\mu\text{g/mL}$. In addition was also observed antiviral activity of divaricatic acid about H1N1 influenza and measles viruses. The diffusion tests on solid medium showed that the ether extract was the most active front bacteria: *B. subtilis* (25 mm), *S. aureus* (17 mm), while the acetone extract was more active for *K. pneumoniae* (9 mm), the chloroform extract did not show significant results. The MIC values ether extract was 40 mg/mL (*B. subtilis*) and 320 $\mu\text{g/mL}$ (*S. aureus*), while the MIC of ACDP to 32 mg/mL for ORSA UFPEDA 728 and UFPEDA 728, and CMI one of 8 mg/mL for *Enterococcus spp.* UFPEDA 854 and UFPEDA 847. In tests of synergistic activity, synergism was only in the ACDP association with levofloxacin in two proportions for ORSA (UFPEDA 728 and UFPEDA 726). For *E. faecalis* (UFPEDA 138) there was synergy at the 7:3 (v/v) with the same antibiotic. The ACDP showed strong antiviral activity protecting 64 and 32 times, respectively viral infection. We conclude that purified divaricatic acid is a new model for the natural treatment of diseases caused by viruses and bacteriadrug.

Keyword: Divaricatic acid. Antibacterial activity. Antiviral activity. Natural products. Synergism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fórmula estrutural do ácido divaricático purificado (ACDP)	21
Figura 2	Cromatografia em camada delgada dos extratos orgânicos do ácido divaricático purificado. D- padrão do ácido divaricático; E extrato etéreo; C-extrato clorofórmico; A-extrato acetônico; CE- cristais do ácido divaricático purificado de <i>Ramalina aspera</i> a partir do extrato etéreo.	42
Figura 3	Espectro em Infravermelho do ácido divaricático purificado de <i>Ramalina aspera</i> a partir do extrato etéreo.	43
Figura 4	Espectro em Ressonância Magnética Nuclear Protônica (RMN- H^{-1}) do ácido divaricático purificado de <i>Ramalina aspera</i> a partir do extrato etéreo.	43
Figura 5	Espectro em Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN- C^{13}) do ácido divaricático purificado de <i>R. aspera</i>	44
Figura 6	Biocromatograma de extrato etéreo de <i>Ramalina aspera</i> utilizando-se <i>Bacillus subtilis</i> . Ex. E - extrato etéreo. D.- ácido divaricático purificado, Halo de inibição. Fonte: autor, 2011.	45
Figura 7	Teste de similaridade entre o ácido divaricático purificado e os antibióticos padrões.	50

LISTA DE TABELA

Tabela 1	Associação das proporções do ácido divaricático purificado com os antibióticos: oxacilina, eritromicina, levofloxacino e clindamicina.	21
Tabela 2	Rendimento dos extratos orgânicos e do ácido divaricático purificado	42
Tabela 3	Teste de difusão em meios sólidos de extratos de etere, cloroformio e acetônico de <i>Ramalina aspera</i> . Concentração de 1,0 mg/ml em DMSO. LEVO: levofloxacino, USN: ácido usnico, MERO: meropenem. *: melhores halos de inibição	43
Tabela 4	Concentração Mínima Inibitória e Concentração mínima bactericida do ácido divaricático purificado frente às espécies de <i>Enterococcus</i> spp. Concentração inicial 1280 µg/ml. (*) melhores Concentração mínima inibitória.	43
Tabela 5	Concentração mínima inibitória e Concentração mínima bactericida dos antibióticos padrões para as linhagens UFPEDA 854 e UFPEDA 138 de <i>Enterococcus faecalis</i> . Concentração inicial de 1280 µg/mL melhores CMI's.	44
Tabela 6	Ensaio sinérgico do ácido divaricático purificado (ACDP) com os antibióticos oxacilina, levofloxacino, clindamicina e eritromicina para linhagem padrão UFPEDA 138 de <i>Enterococcus faecalis</i> e isolado clínico de <i>Enterococcus</i> spp. UFPEDA 854	45
Tabela 7	Ensaio sinérgico do ácido divaricático purificado com os antibióticos: oxacilina, levofloxacino, clindamicina e eritromicina frente à linhagem padrão UFPEDA01 <i>Staphylococcus aureus</i> oxacilina resistente, e isolado clínico UFPEDA 728 ORSA.	50
Tabela 8	Teste para comparação das Concentração mínima inibitória das duas linhagens de <i>Enterococcus</i> . Nível de confiabilidade.	
Tabela 9	Teste <i>t</i> para a atividade sinérgica das espécies de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Enterococcus</i> spp. Nível de confiabilidade 95%.	

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DELITERATURA	15
2.1. MICRORGANISMOS COMO AGENTES INFECCIOSOS.....	15
2.2. PRODUTOS NATURAIS X COMBATE A BACTÉRIASEVÍRUS.....	16
2.3. SUBSTÂNCIAS LIQUÊNICAS X BACTÉRIASEVÍRUS.....	19
2.4. ATIVIDADE SINÉRGICA.....	23
REFERENCIABIBLIOGRÁFICA	24
3 OBJETIVOS	31
3.1 OBJETIVO GERAL.....	31
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	31
4 ARTIGO	32
5 CONCLUSÃO	55
ANEXO	56
ANEXO A - RELATÓRIO TESTES ANTIVIRAIS.....	56

1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica doenças como a ausência de saúde, que ocorrem com uma grande variedade de sinais, sintomas, aspectos anormais, queixas, circunstâncias sociais e causas externas, sendo diferenciada para cada grupo de pessoa. Dentre as doenças que a OMS considera como a falta de uma boa saúde estão: neoplasmas (tumores); doenças do sangue, dos órgãos hematopoiéticos, alguns transtornos imunitários; doenças endócrinas, nutricionais, metabólicas; doenças infecciosas e parasitárias, dentre outras. A cada ano bactérias e vírus são responsáveis por contaminar mais de dois milhões de pessoas, causando, muitas vezes, óbitos por serem resistentes a diversas drogas que se tornaram ineficazes para o tratamento das infecções causadas por esses agentes (BRASIL,2008).

Staphylococcus aureus é uma bactéria do grupo dos Gram – positivo, esférica, e geralmente é encontrada na pele, e nas fossas nasais de pessoas saudáveis. Eles podem causar desde infecções simples, como: espinhas, furúnculos e celulites, até infecções graves, como: pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico, septicemia e outras, podem ser transmitidas, também, através de alimentos contaminados. Esta bactéria vem criando resistência a diversos antibióticos, como a vancomicina, penicilina, oxacilina, ampicilina, entre outros, isto se dá ou por mutação do gene ou genes de resistência de outras bactérias da mesma espécie (ou até de outras) (TAVARES, 2002; BERNARD, 2004; LIMA; ABREU; CASTRO, 2005; SANTOS et al, 2007).

O gênero *Enterococcus* são bactérias Gram-positivas normalmente colonizam o trato intestinal e, em menor frequência, no trato genital feminino e uretras masculinas também causar doenças em seres humanos, tais como: endocardite infecciosa, bacteremia, síndromes diarreicas em recém-nascidos, infecções do trato urinário e infecções de ferida cirúrgica. Esta bactéria vem criando resistência a diversos antibióticos utilizados para o tratamento de doenças causadas por este agente. Assim como o *S. aureus*, eles também são resistentes, a vancomicina, ampicilina, penicilina, entre outros (BABAR, 2013).

As bactérias não são os únicos que são agentes infecciosos preocupantes para a população. Assim com as bactérias, os vírus, também, fazem diversas vítimas e o tratamento para estes microrganismos são poucos. O vírus da influenza H1N1, em 2013, infectou 16 vítimas e ocasionaram duas mortes em Blumenau - SC, os pacientes tinham entre 40 e 50anos de idade (NICOLETTI, 2013). Em Rondônia, foram confirmadas duas mortes

causadas pelo vírus, às vítimas era uma criança de 9 anos e um adulto de 47 anos (MARQUES, 2013). O sarampo é uma infecção do sistema respiratório causada pelo vírus paramixovírus do gênero Morbilivirus. Foram registrados 334 casos com suspeitas da doença e 112 confirmados, com a morte de um bebe de 7 meses, na cidade de Moreno - PE (BRASIL, 2013).

Com a resistência desses microrganismos às drogas já conhecidas, há a necessidade de novos compostos eficazes para o combate a esses agentes que vem causando mortes por todo o mundo. Os compostos de origem natural vêm sendo testados contra microrganismos e já é comprovada sua eficácia na inibição desses agentes patológicos. Neste contexto, encontram-se as substâncias liquênicas que tem ação antimicrobiana comprovada, além de outras atividades biológicas (PAVLOVIC´ et al, 2012). Essas substâncias são fortes candidatas a fármacos inovadores e de grande interesse para as indústrias farmacêuticas, por serem encontradas na natureza e possuírem uma ampla aplicação no tratamento de diversas doenças já é descrito na literatura.

2FUNDAMENTÃO TEÓRICA

2.1 MICRORGANISMOS COMO AGENTES INFECCIOSOS

O conceito de doença varia muito da época, do lugar e da classe social, e reflete um conjunto da situação social, econômica, política e cultural. Depende, também, de valores individuais, de concepções científicas, religiosas e filosóficas. Em certa época, o desejo que os escravos tinham de fugir era considerado doença mental. Estudos paleontológicos afirmam que a doença real, imaginária ou transmissível acompanha a espécie humana desde tempos antigos. Para os antigos hebreus a doença era considerada desobediência do mandamento divino. E em vários outros povos, também, as doenças eram causadas por forças espirituais para castigar quem desobedecia à divindade. Hipócrates, considerado o pai da medicina, postulou, numa visão mais racional, que o homem era uma unidade organizada e entendia a doença como uma desorganização desse estado. No século XVII foi descoberto o microscópio, e com os avanços no final do século XIX no laboratório de Louis Pasteur, estava sendo revelada a existência de microrganismos causadores de doença possibilitando a introdução de soros e vacinas. Fatores etiológicos, pela primeira vez, estavam sendo revelados (SCLAR,2007).

A Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde (Rede RM) coletou dados de 97 hospitais de cinco regiões centrais brasileiras, sobre a ocorrência de microrganismos envolvidos em infecções na corrente sanguínea de pacientes internados na UTI, no período de julho de 2006 a junho de 2008, onde 5.406 microrganismos foram encontrados, os quais 47% eram do gênero *Staphylococcus*, seguidos de 13% de espécie *Klebsiella pneumoniae*, 11 % de *Pseudomonas aeruginosa*, 11% de *Acinetobacter*, 6% *Enterobacter*, 5% *Enterococcus*, e 4% *Candida*. A bactéria menos apontada nas notificações foi a *Escherichia Coli*, 3%, 18% das notificações eram de espécie de *S. aureus*, que são responsáveis por causar endocardite e septicemia (ANVISA,2009).

Já em 2012, no Estado do Rio de Janeiro, foi relatado, um paciente com infecção hospitalar causada por *Enterococcus* resistente a vancomicina (BRASIL, 2012). Em um estudo no período de 2006 a 2009, cerca de 10% de todas as bacteremias foram causadas por *Enterococcus*. Durante este período foram relatados os primeiros casos de bacteremias causadas por *Enterococcus faecalis* ou *Enterococcus faecium* em duas regiões dinamarquesas.

Foram identificadas a incidência de mono e polibacteremia, dos 1.145 casos investigados, 700, o que equivale a 61%, eram casos de monobacteremia. A incidência foi de 19.6/100 000 pessoas por ano (13.0/100 000 pessoas/ano para *E. faecalis* e 6.6/100 000 pessoas/ano para *E. faecium*). 45,7% das bacteremia causadas por *E. Faecalis*, e 85,2% causadas por *E. faecium* foram adquiridas no hospital (PINHOLT et al., 2013).

Cientistas australianos, afirmam que o vírus da gripe influenza H1N1 é resistente ao tamiflu ou também chamado de oseltamivir (medicamento usado atualmente para combater o vírus), e descobrem que ele é sensível ao medicamento Relenza (zanamivir). Em 2009, a gripe infectou um quinto da população no Reino Unido. Os dados dessa pesquisa mostram que uma pandemia em 2009-2010/1-2% houve um aumento na resistência do vírus ao oseltamivir (tamiflur), já no período de 2012-2013 essa resistência permaneceu baixa. Acredita-se que o H1N1 matou 200 mil pessoas (ROBERTS, 2013).

O sarampo é outro vírus que preocupa milhares de pessoas no mundo, na Inglaterra e no país de Gales houve cerca de 2.016 casos confirmados de sarampo, em 2012 (BRASIL, 2013). Reed, 2013, com base nos dados de uma pesquisa, afirma que houve um surto de pessoas com sarampo, que atingiu em média cerca de 700 pessoas em Swansea, e que talvez isso se deva ao fato de que muitas crianças não se vacinaram contra o vírus. Em Gales, houve a suspeita de 1.200 casos de sarampo entre novembro de 2012 a julho de 2013, com o caso de uma morte 88 atendimento no hospital (BRASIL, 2014).

2.2. PRODUTOS NATURAIS X COMBATE A BACTÉRIAS E VÍRUS

A resistência de bactérias a diversas drogas comerciais vem crescendo absurdamente, e é bastante preocupante, pois estas bactérias estão se defendendo de alguma forma aos antibióticos existentes. A OMS, alerta a população para uma era pós-antibióticos, onde não haverá antibióticos eficazes para o combate a esses agentes super-resistentes, tendo em vista isto, muitos pesquisadores vêm tentando encontrar substância novas para solucionar o problema, é o caso de cientistas da Califórnia, que descobriram o antracimicina, um composto extraído da bactéria *Streptomyces* encontrado em sedimentos do Oceano Pacífico, este composto parece ter atividade contra *S. aureus*, e também, demonstrou ser capaz de eliminar o antrax – bactéria conhecida por seu uso em armas químicas de bioterrorismo (BRASIL, 2013).

Uma pesquisa feita nos Estados Unidos da América (EA) mostrou que a proteína do leite, chamada "Alfa-lactoalbumina humana é letal a células tumorais", conhecida como HAMLET, reduziu significativamente a resistência aos antibióticos desenvolvida por alguns patógenos causadores de pneumonias graves e outras infecções de difícil tratamento, como o *S. aureus* metilicilina resistente, aumentando sensibilidade de bactérias a vários antibióticos, como a penicilina e a eritromicina. HAMLET é uma substância que se forma naturalmente no leite humano e não tem efeitos colaterais tóxicos observados comumente nos antibióticos mais fortes, necessários para matar patógenos ultra resistentes (BRASIL,2013).

A apiterapia, que é o uso de produtos derivados das abelhas (mel, pólen, geleia real e apitoxinas), vem sendo estudado quanto a sua atividade antibacteriana, entre outras atividades. Mel Manuka tem sido relatado por apresentar atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas como *S. aureus* e *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella typhimurium* tornando este mel um alimento promissor para o tratamento de feridas ou de úlceras do estômago (LUSBY; COOMBES; WILKISON. 2005; FRENCH; COOPER; MOLAN, 2005; VISAVADIA; HONEYSETT; DANFORD,2007;MANDAL; MANDAL, 2011). Agbagwa e Frank-Peterside (2010), examinaram diferentes amostras de mel: mel nigeriano ocidental, mel nigeriano do sul da Nigéria Oriental e mel do norte da Nigéria, e compararam suas ações de inibição do crescimento de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*), com uma média de zona de inibição 5,3- 11,6 mm, 1,4-15,4 mm, 4,4-13,5 mm e 9,1-17 mm, respectivamente, e com zona de inibição de 6,94-37,94 mm, contra bactérias Gram-positivas *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, bem como bactérias Gram-negativas como *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. enterica serovarTyphi*.

O mel Manuka e trevo mostraram, também, atividade contra o vírus da *varicela zoster*, numa concentração máxima eficaz de 50% (EC50) de aproximadamente 4,5% (wt/vol), comparando a atividade do mel Manuka, observou uma concentração de EC50 menor que a do mel trevo (SHAHZAD, COHRS, 2012). O mel tem grande variedade de propriedades terapêuticas, incluindo antiinflamatório, antibacteriana, antifúngica e atividade antineoplásica. O mel é usado há muito tempo na medicina popular e atualmente vem sendo mais estudado devido à atividade biológica dos seus componentes, é importante mais estudo dos componentes do mel para o combate a infecções de microrganismos patógenos (SWELLAN et al, 2003; JAGANATHAN; MANDAL,2009).

Vários estudos detectaram a presença de peptídeos, enzimas e metabolitos na hemolinfa dos insetos que reduzem a proliferação de bactérias e fungos, esta ação contra esses

microrganismos já é descrito na literatura (GILLESPIE et al, 1997; CARTON; NAPPI, 1997; HULTMARK, 2003; LEULIER et al, 2003). Greco et al, 2009, testaram uma proteína isolada da hemolinfa da *Lonomia obliqua* (Lepdoptera: Saturniidae), em vírus da poliomielite, influenza e sarampo, que apresentou uma redução de 157 vezes (de $3.3 \pm 1,25 \times 10^7$ - $2,1 \pm 1,5 \times 10^5$ dose média infecciosa de cultura de tecido (TCID₅₀ ml⁻¹) na produção de vírus do sarampo e uma redução de 61 vezes (de $2,8 \pm 1,08 \times 10^9$ - $4,58 \pm 1,42 \times 10^7$ mL⁻¹) na produção de vírus da poliomielite. Além disso, a proteína não exibe atividade viricida e não age sobre os receptores na membrana celular.

Sahalan et al, 2007 testaram a hemolinfa da larva de *Musca domestica* Linnaeus e *Chrysomya megacephala* Fabricius e verificaram que a hemolinfa das larvas *M. domestica* lisadas mostraram atividade frente aos microrganismos Gram – positivo *B. subtilis* e *S. aureus*, dois Gram negativos, *E. coli* e *P. aeruginosa*. A hemolinfa de larva e pupa mostrou efeito para *E. coli*. A hemolinfa da larva de *C. megacephala* mostrou efeito bactericida contra ambos os grupos testados Gram-positivos, *B. subtilis* e *S. aureus*, nenhum efeito contra Gram-negativos *E. coli* e *P. aeruginosa*. A pupa apresentou atividade lítica contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*. A larva e pupa da hemolinfa de *M. domestica* e *C. megacephala* demonstrou atividade antibacteriana.

Há muito anos as plantas são utilizadas como medicamento para a cura de diversas enfermidades. Os gregos já utilizavam para a cura de algumas doenças plantas e métodos naturais. Os primeiros documentos escritos foram encontrados na obra chinesa Pen T'sao (“A grande Fitoterapia”) de Shen Nung, que remota a 2800 a.C. (ELDIN; DUNFORD; ANDREW, 2001). Por serem medicamentos que tem um custo reduzido e eficiência comprovada em vários estudos, à busca por fitoterápicos vem sendo cada vez mais intensa. Frasson et al, 2012, avaliaram a atividade anti- *Trichomonas vaginalis* do extrato aquoso da raiz de *Polygala decumbens* que apresentou uma redução de 50% do trofozoíto do *T. vaginalis* com a Concentração Mínima Inibitória (CMI) de 1,56 mg/mL.

Oliveira et al, (2012) avaliaram as atividades antimicrobiana e hemolítica e componentes fitoquímicos dos extratos orgânicos (O ciclo-hexano, acetato de etilo, n-butanol solúvel) e suas frações (n- butanol não- solúveis) de folhas *Buchenavia tetraphylla*. A atividade hemolítica das frações ativas foi verificada. O extrato acetato de etila inibiu o crescimento de *Micrococcus luteus* (CMI: 0,10 mg/mL), *P. aeruginosa* (CMI: 0.20 mg/mL), *Mycobacterium smegmatis* (CMI: 0.39 mg/mL), *Proteus vulgaris*, e *S. aureus* (CMI: 0,78 mg/mL para ambos). As frações mais ativas foram ciclo-hexano e n-butanol solúvel. O ciclo-

hexano apresentou melhor potencial para inibir *M. luteus* (0.10 mg/mL), *P. aeruginosa* (0.20 mg/mL), *Salmonella enteritidis* (0.39 mg/mL) e *S. aureus* (1.56 mg/mL). O n- butanol solúvel apresentou os melhores resultados para *M. luteus* (0.10mg/mL), *M. smegmatis*, *B. subtilis* (0.39 mg/mL para ambos), e *P. vulgaris* (0.10 mg/mL). A concentração de hemólise de 50% (CH50) foram de 20.30, 4.70 e 2.53 mg/mL, respectivamente, para n- butanol solúvel, acetato de etilo e ciclo-hexano. Ressaltando que os valores de CH50 são maiores que os de CMI.

2.3. SUBSTÂNCIAS LIQUÊNICAS X BACTÉRIAS E VÍRUS

Os líquens são organismos provenientes de uma relação simbiótica entre alga, fotobionte, e clorofilada, e um fungo, micobionte e, aclorofilado, que resulta em um talo de estrutura específica (CHAPMAN, 2009; MITROVIĆ et al, 2011). É um ser de difícil posicionamento taxonômico, por ser possuidor de características morfológicas particulares (HALE, 1983; HILL, 1984; NASH III, 1996). Sua definição taxonômica se dá levando em consideração o fungo liquênico, obedecendo ao Código Internacional de Nomenclatura Botânica (PEREIRA, 2000).

O talo líquenico pode se apresentar de formas e cores variadas, dependendo da espécie e das substâncias que o compõem. Estes podem ser crustosos (ex: *Chiodecton*, *Graphis*, *Lecanora*); folhosos (ex: *Collema*, *Lobaria*, *Parmelia*); e fruticulosos (ex: *Cladonia*, *Ramalina*, *Usnea*) (SEAWARD, 1977; ALEXOPOULOS, MIMS, BLACKWELL, 1996). São conhecidos mais de 25.000 mil espécies de líquens, e 1050 compostos secundários foram identificados (STOCKER-WÖRGÖTER, 2008; CHAPMAN, 2009; MITROVIĆ et al., 2011).

A associação da alga, fotobionte, com o fungo, micobionte, produz diversos metabólitos, de origem primária e secundária. Através da fotossíntese a alga produz os hidratos de carbonos necessários para a nutrição, e todas as reações do metabolismo liquênico. Os produtos do metabolismo primário são carboidratos solúveis que ocorrem predominantemente em líquens, à maioria, são os polióis e seus glicosídeos. Dentre os polióis açúcares mais comuns em líquens podem ser citados o glicerol, eritritol, ribitol, arabinitol, D-volemitol, D-sifulitol, bem como glucose, sacarose e trealose, estes são produtos resultantes da atividade fotossintética do fotobionte e ocorrem também, produtos encontrados em plantas superiores. Glucanas (liquenanas e isoliquenanas) e heteropolissacarídeos contendo manose

estão presentes nos líquens em quantidades relativamente altas (HONDA; VILEGAS,1999).

Os produtos do metabolismo secundário, das substâncias liquênicas, podem ser formadas por três vias biossintéticas distintas a do acetato polimalonato, que origina os ácidos graxos, depsídeos, depsidonas, quinonas, e dibenzofuranos; a do ácido chiquímico que produz os pigmentos amarelos (compostos aromáticos); e a do ácido mevalônico, que produz os terpenóides e esteróides. São ainda relatadas as vias dos aminoácidos e a dos carboidratos, onde ocorre a biossíntese dos sacarídeos e polióis. (HALE, 1983; XAVIER-FILHO, 1989; NASH III, 1996). Sabe-se que os líquens variam seu padrão de produção de metabólitos secundários em função do clima (PEREIRA, 1989).

Depsídeos são classes de compostos aromáticos encontrados principalmente em líquens, muitas vezes são encontrados, também, em fungos não liquenizados, e em plantas superiores. São compostos formados pela esterificação de duas ou três unidades fenólicas. Os depsídeos podem ser formados por duas unidades fenólicas derivadas do orcinol. Esses depsídeos são formados pela esterificação da carboxila na posição 1 da primeira unidade com a hidroxila da posição 4' ou da posição 3' da segunda unidade. Os compostos resultantes são para-depsídeos e meta-depsídeos da serie do orsinol. Dentre os para- depsídeos se encontra o ácido divaricático, que apresenta o orcinol como molécula precursora da sua biossíntese, sendo, portanto, um derivado fenólico. A co-ocorrência de ácido divaricático (Figura 1) e ácido sequicáico em varias espécies de *Ramalina* fornece evidências de que meta-depsídeos podem se originar por hidroxilação do C3' de para-depsídeos, seguida de rápido rearranjo à forma termonidâmica (HONDA; VILEGAS, 1999).

As substâncias liquênicas são responsáveis pela maioria da utilidade econômica e dos benefícios curativos advindos dos líquens (NASH III, 1996).

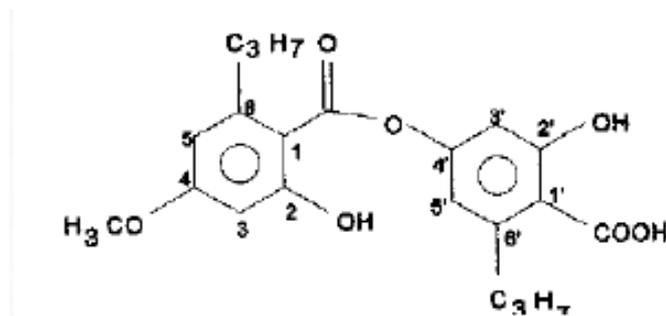


Figura 1. Formula estrutural do ácido divaricático purificado. Fonte: Pessoa, 2013.

A atividade antibacteriana das substâncias líquênicas esta amplamente descrita na literatura. A ação antimicrobiana dos metabólitos líquênicos tem sido estudada desde 1944 por Burkholder e colaboradores (BURKHOLDER et al., 1944, apud RIBEIRO et al, 2006), e desde então várias substâncias foram identificadas como agentes antibióticos, sendo sua ação bacteriostática e bactericida comprovada principalmente contra bactérias Gram positivas (BUSTINZA; ENDEAVOUR, 1951). As substâncias ativas são em geral depsídeos (como o ácido divaricático), depsidonas e ácidos únicos, dentre outras classes de compostos, alguns ainda não identificados (FAHSELT 1994; HUNECK 1999; MULLER2001).

Falcão et. Al, (2004), em testes com os extratos, etéreo, clorofórmio e acetônico da *Ramalina solediosa*, confirmaram que os extratos etéreos e clorofórmico foram ativos frente aos microrganismos *B. subtilis* e *S. aureus*, sendo o etéreo o mais ativo. Gulluce et. al. (2006), em estudos com *Ramalina pollinaria* comprovaram a atividade antimicrobiana deste líquen, testando em 35 microrganismos e destes inibiu o crescimento de 11 bactérias. Segundo Moura (2008), em ensaios antimicrobianos utilizando os extratos etéreo, clorofórmico e acetônico a frio de *Canoparmelia texana* foi ativa contra todas as bactérias testadas, tanto as Gram - positivas como as Gram - negativas, para o extrato a quente só houve ação do etéreo, que foi o que apresentou uma quantidade maior do ácido divaricático.

Martins et., al., (2010), avaliaram a composição química e atividade antimicrobiana do líquen *Cladia aggregata* Nyl (Sw.), que contem o ácido barbático, um depsídeo, que foi analisado espectroscopicamente e testado, bem como os extratos orgânicos (etéreo, clorofórmico e acetônico). Os extratos e a substância purificada foram testados contra quatro cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistente. Os ensaios biocromatográficos mostraram ação desse composto, juntamente com outras substâncias neles contidos sugerindo uma ação sinérgica. A CMI variou entre os isolados de *S. aureus* foi 50000 µg/mL para todas as linhagens, com exceção de altamente resistente 404 IC, cuja CMI foi 10000 µg/mL.

Kosanić; Ranković 2010, avaliaram a atividade antimicrobiana dos extratos de acetona, metanol e solução aquosa dos líquens *Lecanora atra*, *L. muralis*, *Parmelia saxatilis*, *P. sulcata* e *P. ambigua*. Essas espécies de líquens foram analisadas *in vitro* contra seis espécies de bactérias e dez espécies de fungos, através do método de difusão em disco, e pela determinação da concentração inibitória mínima (CMI) através do método de diluição em caldo no tubo. Os extratos aquosos dos líquens testados não mostraram qualquer atividade antimicrobiana em qualquer um dos microrganismos de ensaio, diferente dos extratos de acetona e metanol que mostraram ação antimicrobiana. O extrato acetônico, do líquen *P.*

sulcata, foi o mais ativo, com o valor da CMI de 780 µg/ml. Entre as bactérias o mais sensível foi à espécie *Bacillus mycoides*, e entre os fungos foi o *Botrytis cinerea* e *Candida albicans*. A bactéria *E. coli* foi resistente a todos os extratos de líquens testados. Os extratos orgânicos obtidos dos líquens tiveram atividade antimicrobiana relativamente forte, que pode ser muito importante no tratamento de numerosas doenças causadas por microrganismos semelhantes.

Srivastava, et al 2013 testaram os extratos acetônico, metanólico e etanólico de *Usnea ghattensis* G. Awasthi (Usneaceae), e mostraram que o extrato etanólico foi mais eficaz contra *B. cereus* e *P. aeruginosa* com uma zona de inibição de $29,8 \pm 0,6$ mm e $12,3 \pm 0,5$ mm, a uma concentração de 200 µg/mL. Os extratos acetônico e metanólico demonstraram atividade quase semelhante contra o *S. aureus* e a zona de inibição foi de $24,6 \pm 0,5$ e $24,7 \pm 0,4$ mm. Só o extrato metanólico mostrou atividade contra *S. faecalis* com uma zona de inibição de $13,5 \pm 0,8$. Valor de CMI observado contra *S. aureus* e *S. faecalis* foi de 6.25 µg/mL e 25 µg/mL, enquanto que contra *B. cereus* e *P. aeruginosa*, o valor de CMI calculado foi de 3.125 µg/mL e 200 µg/mL, respectivamente, mostrando que este líquen teve uma atividade bastante alta não só contra bactérias Gram positivo, mas significativamente também contra Gram negativo, podendo ser uma fonte de agentes antimicrobianos eficazes.

Shinazi et. al (1990), observaram que os componentes líquênicos das classes das antraquinonas são de grande importância, por apresentar propriedades antivirais contra o vírus HIV. Cohen e Towers (1996) mostraram que, as antraquinonas derivadas de *Heterodermia obscurata* exibiram atividade contra o vírus do herpes simples tipo E. Simone et al. (2007), avaliaram a ação antiviral do líquen *Parmelia perlata*, e observaram que as frações polissacarídicas brutas possuem atividade contra o vírus da febre amarela com uma concentração inibidora (IC50) de 15 µg/mL. No teste de citotoxicidade, as frações foram tóxicas para as células L20, Vero e HEp- 2, nas concentrações acima de 500 µg/mL.

Sokolov et al (2012) testaram um total de 26 formas isoméricas (+) e (-) do ácido úsnico e seus derivados contra o vírus da influenza H1N1, e mostraram que os compostos: (-)-1, (+)-3, (+)-4, (+)-5b, (+)- e (-)-6, (+)-7, (+)- 8, - e (-)-11, - e (-)-12, (+)-13, sendo a formulado enantiômeros (-)- mais ativa do ácido úsnico, quanto à inibição da reprodução viral, comparado ao isômero (+)-. O ácido úsnico e os seus derivados mostraram possuir atividade inibidora contra o vírus do herpes tipo 1, papiloma vírus e Epstein-Barr vírus (PERRY et al, 1999; SCIRPA et al, 1999; YAMAMOTO et al, 1995).

2.4 ATIVIDADE SINÉRGICA

O sinergismo é a obtenção de uma resposta farmacológica a partir da associação de dois ou mais medicamentos, cujo resultado é maior que a simples soma dos efeitos isolados de cada um deles (SECOLI, 2001). O sinergismo pode ter efeito aditivo, que são medicamentos que possuem o mesmo mecanismo de ação, ou efeito de somação, que agem de modos diferentes, ou ainda podem ter efeitos de potencialização, que atuam em diferentes receptores farmacológicos. Tendo em vista a eficácia antimicrobiana de produtos naturais no tratamento de diversas infecções causadas por bactérias, a prática da combinação de drogas comerciais com as substâncias bioativas vem se tornando cada vez mais utilizada para combater esses agentes (SATO et al, 2004; ZAY-CHANG et al,2009).

Devido à alta incidência de doenças infecciosas que vêm surgindo causadas por bactérias e vírus, pela resistência destes microrganismos a alguns antibióticos e antivirais, o combate a essas bactérias estão cada vez mais ineficazes (VALGAS et al, 2007), portanto, torna-se indispensável o estudo de novas substâncias antimicrobianas. Uma alternativa para o combate a esses microrganismos é o uso de fitoterápicos, que podem ser obtidas através de extração dos compostos liquênicos. Nesse contexto, as substâncias liquênicas merecem grande atenção, por possuírem ampla gama de aplicações biológicas, inclusive, com ação antibiótica, entretanto ainda pouco exploradas (SRIVASTAVA, P;UPRETI;DHOLE;SRIVASTAVA, APURVA, 2013).

Arruda 2010 testou, por meio de difusão em disco de papel, o ácido úsnico purificado e os extratos étereo, clorofórmico e acetônico de *C. substellata* em combinação com drogas comerciais em linhagens padrões e isolados clínicos de *S. aureus* oxacilina resistente e linhagens de *P. aeruginosa* e mostrou que houve uma ótima inibição dos compostos estudados.

REFERENCIABIBLIOGRÁFICA

AGBAGWA OE, FRANK-PETERSIDE N. Effect of raw commercial honeys from Nigeria on selected p pathogenic bacteria. **African Journal of Microbiol**, v. 4: p. 1801-1803, 2010.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. New York, Wiley Sons, Ed. 4, p. 869, 1996.

ANVISA, **Indicadores traçam panorama da resistência no Brasil**. 2009. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/busca!/ut/p/c5/jZDJBoNADlafhOeIqxqFhKEcyLMMSlhTCckEQAkUQoCVqRzx9QOo1qPbJvXZ8odStHSf_zR1_miGPu9QjFKcWT41dABecoN3BYxDcKaSRVxtv1_yBGfwomRYaaLL9CDay4yPBAXdcLDuDuH_0y5_9ze2P7Nm2itO6GYvKxUq4tUwa5VITIPM1H6GjBm6gN6pJCvUeLZw8t7aqpRYIIoDkRNghZdO9az4bHcZfe2760mFx6aPXF7KvmYlz5CWpYX9gtOGcBjZ0-qY8kde0r83CRfdKQQ9Hqe9vAmm_4dehvw6HxHobxfGsrmeOeNybe4g!/?1dmy&urile=wcm%3apath%3a//Anvisa%20Portal/Anvisa/Sala%20de%20Imprensa/Assunto%20de%20Interesse/Noticias/Indicadores%20tracam%20panorama%20da%20resistencia%20no%20Brasil> Acesso em : 17 de jan. 2014.

ARRUDA, A. C. P. **The synergistic activity of antibiotics with *Cladonia substellata* (lichen) compounds against different strains of bacteria**. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia. Universidade Federal de Pernambuco, 2010.

BABAR, N.; Usman, J.; Munir, T.; Gill, M. M.; Anjum, R.; Gilani, M.; Latif, M. Frequency and Antibioqram of Vancomycin Resistant Enterococcus in a Tertiary Care Hospital. **Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan**, vol. 24 (1): p. 27-29, 2014.

BERNARD, L. Comparative analysis and validation of different assays for glycopeptide susceptibility among methicillin-resistant *S. aureus* strains. **Journal Microbiological Methods**, v. 57, p. 231-9, 2004.

BURKHOLDER, P.R.; A. W. EVANS; I. MCVEIGH; H. K. THORNTON. Antibiotic activityof lichens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 30, p. 250–255, 1944.

BUSTINZA, F.; ENDEAVOUR 1951, *10*, 95. CHAPMAN, A.D. 2009: Numbers of living species in Australia and the world. **Australian Biological Resources Study (ABRS)**. Canberra. v. 10 p. 80- 95, 1951

BRASIL. **Organização Mundial da Saúde. Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde**, CID, Organização Mundial da Saúde, 2008.

BRASIL, **Pacientes denunciam superbactéria e lotação em hospital de Bonsucesso. G1. Rio de Janeiro, 2012**. Disponível em <http://g1.globo.com/rio-de-janeiro/noticia/2012/10/pacientes-denunciam-superbacteria-e-lotacao-em-hospital-de-bonsucesso.html>> Acesso: 16 de jan.2014.

BRASIL. **Aumento no número de casos de sarampo em PE antecipa vacinação. G1. pernambuco, 2013**. Disponível

em:<http://g1.globo.com/pernambuco/noticia/2013/11/aumento-no-numero-de-casos-de-sarampo-em-pe-antecipa-vacinacao.html>> Acesso em: 06 de jan. 2014.

BRASIL, **Bactérias resistentes 'ameaçam mais que aquecimento global'**. G1. Inglaterra, 2013. Disponível em <<http://g1.globo.com/ciencia-e-saude/noticia/2013/01/bacterias-resistentes-ameacam-mais-que-aquecimento-global.html>> Acesso: 01 de fev. 2014.

BRASIL, **Novo antibiótico que ataca superbactéria é encontrado no mar**. G1. Califórnia, EUA, 2013 <<http://g1.globo.com/ciencia-e-saude/noticia/2013/08/novo-antibiotico-que-ataca-superbacteria-e-encontrado-no-mar.html>> Acesso: 01 de Fev. 2014.

BRASIL, **Leite materno reduz resistência de bactérias a antibióticos, diz estudo**. Bem estar. Estados Unidos, 2013. <<http://g1.globo.com/bemestar/noticia/2013/05/leite-materno-reduz-resistencia-de-bacterias-antibioticos-diz-estudo.html>> Acesso: 2 de Fev. 2014.

BRASIL, **Long shadow cast by MMR scare**. BBC news. Inglaterra. 9 de abril, 2013. Disponível em : <<http://www.bbc.co.uk/news/health-22085678>> Acesso em: 5 de fev. 2014.

BRASIL. **Jabs plea after more measles cases at Gower College, Swansea**. Swansea. 29 de jan de 2014. Disponível em: <<http://www.bbc.co.uk/news/uk-wales-south-west-wales-25952854>> Acesso em: 5 de fev. 2014.

CARTON, Y., NAPPI, A.J. Drosophila cellular immunity against parasitoids. **Parasitology**. v. 6, p. 218–227. 1997.

CHAPMAN, A.D. Numbers of living species in Australia and the world. **Australian Biological Resources Study (ABRS)**. Canberra. v. 80 p. 2009.

COHEN, P. A.; TOWERS, G. H. N. Biosynthetic studies on chlorinated anthraquinones in the lichen *Nephroma laevigatum*. **Phytochemistry**, v. 42, p. 1352- 1329, 1996.

ELDIN, SUE. DUNFORD, ANDREW. **Fitoterápicos na atenção primária à saúde**. Ed. **Manole**, Cap. 2. p. 7. 2001.

ESIMONE, C O. OFOKANSI K C. ADIKWU, M U. IBEZIM, E C. ABONYI, D O. ODAIBO, G N. OLALEVE, D O. In vitro evaluation of the antiviral activity of extracts from the lichen *Parmelia perlata* (L.) Ach. against three RNA viruses. **Journal Infection in Developing Countries**. v. 1;1, n.3, p. 315-20. 2007.

FALCÃO, S. P. E. DA, SILVA, H., N. DA, GUSMÃO, B. N. RIBEIRO, M. S. PEREIRA, C. E. Atividade antimicrobiana de derivados fenólicos do líquen *Ramalina sorediosa* (B. de Lesd.) Laundron. **Acta Botanica Brasilica**. v. 18, n.4, p. 911- 918. 2004.

FAHLSELT, D. Secondary biochemistry of lichens. **Symbiosis** v. 16, p. 117–165, 1994.

FRASSON, A. P.; SANTOS, O. dos; DUARTE, M.; TRENTIN, D. da S.; GIORDANI, R. B.; SILVA, A. G. DA.; SILVA, M. V. DA; TASCA, T.; MACEDO, A. J. First report of anti-

Trichomonas vaginalis activity of the medicinal plant *Polygala decumbens* from the Brazilian semi-arid region, Caatinga. **Parasitology Res.** v.110, p. 2581–2587. 2012.

FRENCH VM, COOPER RA, MOLAN PC. The antibacterial activity of honey against *Staphylococci* coagulase-negative. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, p. 228-231. 2005.

GILLESPIE, J.P., KANOST, M.R., TRENCZEK, T. Biological mediators of insect immunity. **Annual Review Entomology**. v. 42, p. 611–643. 1997.

GULLUCE, M., ASLAN, A., SOKMEN, M., SAHIN, F., ADIGUZEL, A., AGAR, G., SOKMEN, A. Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Parmelia saxatilis*, *Platismatia glauca*, *Ramalina pollinaria*, *Ramalina polymorpha* and *Umbilicaria nylanderiana*. **Phytomedicine**, v. 13, p. 515–521. 2006.

GRECO, KATIA N.; MENDONÇA, RITA MARIA Z.; MORAESA, ROBERTO H.P.; MANCINI, DALVA. A.P.; MENDONÇA, RONALDO Z. Antiviral activity of the hemolymph of *Lononia obliqua* (Lepidoptera: Saturniidae). **Antiviral Research**. v. 84, p. 84–90. 2009.

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

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

HONDA, N., K.; VILEGAS, W. A química dos liquens. **Quimica Nova**. v. 22, n.1, p. 25-55. 1999.

HULTMARK, D. *Drosophila* immunity: paths and patterns. **Current Opinion in Immunology**. v.1, p. 12–19, Review. 2003.

HUNECK, S.; AHMADJIAN, V.; HALE, M. E **Nature of lichen substances**; In The Lichens;Ed.; **Academic Press**, New York, p 495, 1973.

HUNECK, S. The significance of Lichens and Their Metabolites. **Natur Wissenschaften Review article**, v. 86, 559-570, 1999.

JAGANATHAN SK, MANDAL M. Antiproliferative effects of honey and of its polyphenols: a review. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. v . 2009, p 13. 2009.

KOSANIĆ, M.; RANKOVIĆ, B. Screening of Antimicrobial Activity of some lichen species *in vitro*. **Kragujevac Journal Science**. v. 32, p. 65-72. 2010.

LEULIER, F., MARCHAL, C., MILETICH, I., LIMBOURG-BOUCHON, B., BENAROUS, R., LEMAITRE, B. Directed expression of the HIV-1 accessory protein Vpu in *Drosophila* fat body cells inhibits Toll-dependent immune responses. **EMBO Rep**. v. 4, p. 976–981, 2003.

LIMA, D. C. ABREU, P. A.; CASTRO, H.C. Snake venom: any clue for antibiotics and cam? **Evidence- Based Complementary Alternative Medicine**, v. 2, n. 1, p. 39-47, 2005.

LUSBY PE, COOMBES AL, WILKINSON JM. Bactericidal activity of different honeys against pathogenic bacteria. **Archives of Medical Research**; v. 36: 464-467. 2005.

MANDAL, M. D.; MANDAL, S. Honey: its medicinal property and antibacterial activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**; v. 1, n.2, p. 154-160, 2011.

MARTINS, B.,C., M.; MARCIO JAMES GONÇALVESDE LIMA, SILVA, P., F.;XIMENES, A., E.; SILVA, H., N.; PEREIRA, C., E.; *Cladia aggregata* (lichen) from Brazilian Northeast: Chemical Characterization and Antimicrobial Activity. **Brazilian Archives of Biology and Technology Aninternational Journal**. v. .53, n. 1: p. 115-122,2010.

MARQUES, E. **Agevisa confirma mais uma morte por influenza A H1N1 em Cujubim**, RO. G1. Rondônia. 23 de jul. 2013. Disponível em: <<http://g1.globo.com/ro/rondonia/noticia/2013/07/agevisa-confirma-mais-uma-morte-porinfluenza-h1n1-em-cujubim-ro.html>> Acesso: 06 de jan.2014.

MITROVIC, T., STAMENKOVIĆ, S., CVETKOVIĆ, V., NIKOLIĆ, M., TOŠIĆ, S., STOJIĆIĆ, D. Lichens as source of versatile bioactive compounds. **Biologica Nyssana.**, v. 2, n.1, p. 1-6 September. 2011.

MOURA, M. C. G.G., **Atividade antimicrobiana de compostos de *Canoparmelia texana* (Tuck.) Elix & Hale (líquen)**. Dissertação de mestrado em Bioquímica pela Universidade de Pernambuco. 2008.

MULLER, K.: Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 56: 9-16. 2001.

NASCIMENTO, A., T. SERAFIM DO. **Bioprodução de Metabólitos de *Canoparmelia texana* (TUCK.) ELIX e HALE a partir de imobilização celular**. Dissertação de Mestrado em Bioquímica pela Universidade de Pernambuco. 2007.

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

NICOLETTI, J. **Dois pacientes estão internados na UTI com H1N1, em Blumenau**. G1. Santa Catarina. 14 de nov. 2013. Disponível em: <<http://g1.globo.com/sc/santacatarina/noticia/2013/11/dois-pacientes-estao-internados-na-uti-com-h1n1-emblumenau.html>> Acesso: 06 de jan.2014.

OLIVEIRA, Y.L. C. DEOLIVEIRA; SILVA, L. C. N.DA; SILVA, A. G. DA; MACEDO, A.J.; ARAÚJO, J.M.DE; CORREIA, M.T.DOSS.; SILVA, M.V.da. Antimicrobial Activity and Phytochemical Screening of *Buchenavia tetraphylla* (Aubl.) R. A. Howard (Combretaceae: Combretaceae). **The Scientific World Journal** . v. p. 6, 2012.

PAVLOVIĆ, V., STOJANOVIC, I, JADRANIN, M., VAJS, V., DJORDJEVIC, I., SMELCEROVIC, A., STOJANOVIC, G. Effect of four lichen acids isolated from *Hypogymnia physodes* on viability of rat thymocytes. **Food and Chemical Toxicology**.

2012.

PEREIRA, E. C. Efeito da sazonalidade na detecção da atividade antimicrobiana em *Cladonia* e *Cladina* (liquens). **Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Pernambuco**, p. 209, 1989.

PEREIRA, E. C. **Biologia de Liquens**. Apostila do curso oferecido pelo Depto. De Ciências Geográficas, Centro de Filosofia e Ciências Humanas da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, p. 2-28, 2000.

PERRY, N. B.; BENN, M. H.; BRENNAN, N. J.; BURGESS, E. J.; ELLIS, G.; GALLOWAY, J.; LORIMER, S. D.; TANGNEY, R. S. Antimicrobial, Antiviral and Cytotoxic Activity of New Zealand Lichens. **Lichenologist**, v. 31, p. 627.1999.

PRIYA SRIVASTAVA, 1 D. K. UPRETI, T. N. DHOLE, APURVA K. SRIVASTAVA, ANDMEGHANAND T. NAYAK. Antimicrobial Property of Extracts of Indian Lichen against Human Pathogenic Bacteria. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases.**, v. 2, p. 6, 2013.

PINHOLT, M.; ØSTERGAARD, C.; ARPI, M.; BRUUN, N.E.; SCHØNHEYDER, H.C.; GRADEL, K.O.; SØGAARD, M.; KNUDSEN, J. D.; FOR THE DANISH COLLABORATIVE BACTERAEMIA NETWORK (DACOBAN)† Incidence, clinical characteristics and 30-day mortality of enterococcal bacteraemia in Denmark 2006–2009: a population-based cohort study. **Clinical microbiology and infection**, v. 20, p. 145-151, 2013.

REED, J. Sarampo. País de Gales. 10 de abril 2013. Disponível em: <<http://www.bbc.co.uk/newsbeat/22089413>> Acesso em: 5 de fev 2014.

RIBEIRO, S.M.; PEREIRA, E.C.; SILVA, N.H.; FALCÃO, E.P.S.; GUSMÃO, N.B.; HONDA, N.K. & QUILHOT, W. Detection of antibacterial activity of lichen substances through microdilution tests. **Lichenology in Latin America II**. Hamburg, Mitt. Inst. Allg. Bot. Hamburg. p. 187-194. In: Calvelo, S. & Feuerer, T. (Org.). 2002.

RIBEIRO, M., S.; PEREIRA, C., E; GUSMÃO, B., N.; FALCÃO, P., E; SILVA, H., N. Produção de metabólitos bioativos pelo líquen *Cladonia substellata* Vainio¹. **Acta botânica brasiliense** v. 20, n.2, p. 265-272. 2006.

ROBERTS, M. **Drug-resistant pandemic swine flu 'community risk'**. BBC news. Austrália, 18 de Marc 2013. Disponível em: <http://www.bbc.co.uk/news/health-21828245> Acesso em: 4 de fev. 2013.

SAHALAN, AHMAD ZORIN; OMAR, BAHARUDIN; MOHAMED, AIMA YUSIRAH; JEFFERY, JOHN. Antibacterial activity of extracted hemolymph from larvae and pupae of local fly species, *Musca domestica* and *Chrysomya megacephala*. **Jurnal Sains Kesihatan Malaysia**. v. 4 (2), p. 1-11, 2007.

SATO, M.; TANAKA, H.; YAMAGUCHI, R.; KATO, K.; ETOH, H. Synergistic effects of mupirocin and an isoflavonone isolated from *Erythrina variegata* on growth and recovery of methicillin – resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal Antimicrobial**

Agents v. 24 p. 43- 48, 2004.

SANTOS, L. DOS A., SANTOS, O. D., FREITAS, C. DE, C., FERREIRA, A. L. B., AFONSO, F. I., RODRIGUES, R. C., CASTRO, C. H. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa importância hospitalar. **Journal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 43 n. 6 p. 413-423. 2007.

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

SECOLI, S.R. Interações medicamentosas: fundamento para pratica clinica da enfermagem. **Revista da Escola de Enfermagem**, v. 35, n.1, p. 28-34. 2001.

SCLIAR, M. Historia do Conceito da Saúde. **PHYSIS: Revista de Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 17, n.1, p. 29-41. 2007.

SCHINAZI, R. F.; CHU, C. K.; BABU, J. R.; OSWALDO, B. J.; SAALMANN, V.; ERICKSSON, B. F.; NASR, M.; CANNON, D. L. Anthraquinones as a new class of antiviral agents against human immunodeficiency virus. **Antiviral Research**, v. 13, p. 265-272. 1990.

SCIRPA, P.; SCAMBIA, G.; MASCIULLO, V.; BATTAGLIA, F.; FOTI, E.; LOPEZ, R.; VILLA, P.; MALECORE, M.; MANCUSO, S. MINERVA GINECOL. A zinc sulphate and usnic acid preparation used as post-surgical adjuvant therapy in genital lesions by human Papillomavirus. **Minerva Ginecologica**, v. 51, no. 6, p. 255-260, 1999.

SHAHZAD, AAMIR; COHRS. RANDALL J. In vitro antiviral activity of honey against varicella zoster virus (VZV): A translational medicine study for potential remedy for shingles. **National Institute of Health**. v. 3, n.2, p. 1-7. 2012.

SOKOLOV, DMITRIY N.; ZARUBAEV, VLADIMIR V.; SHTRO, ANNA A.; POLOVINKA, MARINA P.; LUZINA, OLGA A.; KOMAROVA, NINAI.; SALAKHUTDINOV, NARIMAN F.; KISELEV, OLEG I. Anti-viral activity of (-)- and (+)- usnic acids and their derivatives against influenza virus A(H1N1)2009. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 22, p. 7060–7064. 2012.

SRIVASTAVA, P.; UPRETI, D. K.; DHOLE, T. N.; SRIVASTAVA, APURVA. K. In-vitro evaluation of the antimicrobial activities of lichen *Usnea ghattensis*. **International Journal of current Microbiology and Applied Sciences**. v. 2 N. 5, p. 271-279. 2013.

STOCKER-WORGOTTER E., Metabolic diversity of lichen-forming ascomycetous fungi: culturing, polyketide and shikimate metabolite production, and PKS genes. **Natural Product Reports**. v. 25, p. 188 – 200. 2008.

SWELLAM T, MIYANAGA N, ONOZAWA M, HATTORI K, KAWAI K, SHIMAZUI T, AKAZA H. Antineoplastic activity of honey in an experimental bladder cancer implantation model: in vivo and in vitro studies. **Journal International Urology**. v. 10, n.4, p.213–219. 2003.

TAVARES, W. CONSTANT, J. M. C.; AUTO, H. F.; Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos: Normas gerais da Antibioticoterapia. Acidentes da antibioticoterapia.

Mecanismos de ação dos antibióticos. Resistência bacteriana. Interações de drogas, associações de ntibióticos. **Editora Atheneu**, caps. 1 e 5. 2002.

TRABULSI, R. L., ALTHERTUM, F., **Microbiologia**. Atheneu, 5º edição, 2008.

VALGAS, C.; SOUZA DE, S. M.; SMANIA, E. F. A.; JUNIOR, A. S. Métodos de triagem para determinação de atividade antibacteriana de produtos naturais. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 38. n. 2. p. 38: 369-380, 2007.

VISAVADIA BG, HONEYSETT J, DANFORD MH. Manuka honey dressing: An effective treatment for chronic wound infections. **British Journal of oral and Maxillofacial Surgery**; v. 44, p. 38-41.2006.

XAVIER-FILHO, L. **Inibição Fotooxidativa de b-Caroteno por Cloroatranorina de *Parmelia tinctorum* Nyl**. João Pessoa: UFPB. Tese de Titular - Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, UFPB. 1989.

YAMAMOTO, Y.; MIURA, Y.; KIMOSHITA, Y.; HIGUCHI, M.; YAMADA, Y.; MURAKAMI, A.; OHIGASHI, H.; KOSHIMIZU, K. **Chemical Pharmaceutical Bulletin** v. 1995, p. 43, 1388.

ZAY-CHANG, Y.; BO-CHU, W.; XIAO-SHENG, Y.; QIANG, W.; LIANG, R. The synergistic activity of antibiotics combined with eighth traditional Chinese medicines against two different strains of *Staphylococcus aureus*. **Colloids and Surface B: biointerfaces** v. 41 p. 79-81, 2005.

3OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

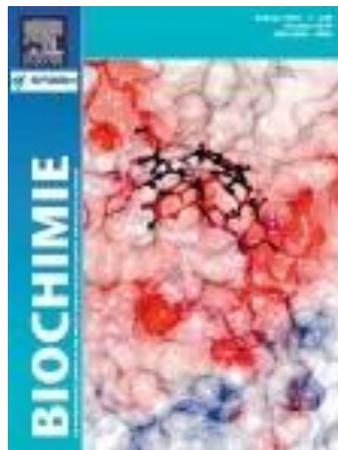
Avaliar a ação antibacteriana e antiviral do ácido divaricático purificado de *Ramalina aspera* frente a microrganismos infecciosos.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS

- Coletar o material liquênico
- Obter o extratos orgânicos
- Isolar, purificar e identificar o ácido divaricático do líquen *Ramalinaaspera*.
- Avaliar a capacidade antibiótica do composto liquênico, frente a bactérias Gram -positivas e isolados clínicos multirresistentes.
- Determinar a Concentração Mínima Inibitória da substância liquênica frente aos microrganismos maissensível.
- Avaliar a atividade sinérgica do ácido divaricático purificado em associação com drogascomerciais;
- Avaliar a ação antiviral do ácido divaricático purificado frente a víruscontagiosos.

4ARTIGO 1

***SYNERGISTIC ACTIVITY OF PURIFIED DIVARIC ACID OF LIQUEN RAMALINA
ASPIRA FRONT LINE OF ENTEROCOCCUS sp. AND STAPHYLOCOCCUS AUREUS
OXACILLIN- RESISTANT***



Artigo a ser publicado no periódico Biochimie An International Journal of Biochemistry and Molecular Biology no formato original (**FI: 3. 123; QUALIS CB II: B1**).

**ATIVIDADE SINERGICA DO ÁCIDO DIVARICÁTICO PURIFICADO DO LIQUEN
RAMALINA ASPERA FRENTE LINHAGENS DE *ENTEROCOCCUS sp. E*
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS OXACILINA-RESISTENTE***

Cordeiro, B. M. P. C¹; Martins, M. C. B²; Gomes, N. M. F.³; Silva, T. D.¹; Gonçalves, J. P¹;
Solidonio, E. G.⁴; Arruda, F. V.F.⁵; Sena, K. X. F. R. ⁴; Falcão, E. P.S⁶; Pereira, E. C. G⁷; N.
B. Gusmão. ⁵; Silva, N. H²

¹ Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, UFPE, PE, Brasil; ² Laboratório de Química de Produtos Naturais, Departamento de Bioquímica UFPE, PE, Brasil; ³ Faculdade Integrada de Pernambuco, FACIPE, PE, Brasil; ⁴ Laboratório de Fármacos e Ensaio Antimicrobianos, Departamento de Antibióticos, UFPE, PE, Brasil; ⁵ Laboratório de Microbiologia Ambiental e Industrial, Departamento de Antibióticos, UFPE, PE, Brasil; ⁶ Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão, UFPE, PE, Brasil; ⁷ Departamento de Ciências Geográficas, UFPE, PE, Brasil.

*Corresponding author

Prof^o. Dr^o. Nicácio Henrique da Silva Laboratório de Química de Produtos Naturais
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n, 50780-901 Recife –PE, Brasil.

Phone: +55 81 2126 8541; Fax: +55 81 2126 8540

e-mail: nicacio_hsilva@hotmail.com

**ATIVIDADE SINÉRGICA DO ÁCIDO DIVARICÁTICO PURIFICADO DO LIQUEN
RAMALINA ASPERA FRENTE LINHAGENS DE *ENTEROCOCCUS* sp. E
STAPHYLOCOCCUS AUREUS OXACILINA-RESISTENTE**

Cordeiro, B. M. P. C¹; Martins, M. C. B²; Gomes, N. M. F.³; Silva, T. D.¹; Gonçalves, J. P.¹; Solidonio, E. G.⁴; Arruda, F. V. F.⁵; Sena, K. X. F. R.⁴; Falcão, E. P. S⁶; Pereira, E. C. G⁷; N. B. Gusmão.⁵; Silva, N. H².

¹ Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, UFPE, PE, Brasil; ² Laboratório de Química de Produtos Naturais, Departamento de Bioquímica UFPE, PE, Brasil; ³ Faculdade Integrada de Pernambuco, FACIPE, PE, Brasil; ⁴ Laboratório de Fármacos e Ensaio Antimicrobianos, Departamento de Antibióticos, UFPE, PE, Brasil; ⁵ Laboratório de Microbiologia Ambiental e Industrial, Departamento de Antibióticos, UFPE, PE, Brasil; ⁶ Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão, UFPE, PE, Brasil; ⁷ Departamento de Ciências Geográficas, UFPE, PE, Brasil.

RESUMO: As bactérias e vírus, responsáveis por fazer milhões de vítimas, estão mais resistentes a drogas já existentes. Este trabalho teve como objetivo avaliar a ação antibiótica dos extratos etéreos, clorofórmico e acetônico e ação sinérgica do ácido divaricático purificado do líquen *Ramalina aspera*. Estes foram ativos contra as bactérias *B. subtilis* (extrato etéreo 25 mm, clorofórmico 21 mm e acetônico 14 mm), *K. pneumoniae* (extratos clorofórmico 8 mm e acetônico 9 mm), *S. aureus* (linhagem não resistente) (extrato etéreo 17 mm, clorofórmico 8 mm, acetônico 9 mm), com exceção da *Salmonella enteridis* e *M. luteus*. O extrato etéreo foi mais ativo contra o microrganismo *B. subtilis* (25 mm) e *S. aureus* (17 mm), tanto no teste de disco como na CMI. O ácido divaricático purificado teve melhor valor de CMI para os isolados clínicos de espécies do gênero *Enterococcus*, com valores de CMI variando entre 8 µg/ml, 16 µg/ml e 32 µg/ml. O ensaio de sinergismo mostrou que houve ação sinérgica entre o ácido divaricático purificado em associação com levofloxacino nas duas proporções (7:3, 5:5 v/v) para os ORSA (UFPEDA 728 e UFPEDA 726). Para o *E. faecalis* (UFPEDA 138) houve sinergismo na proporção 7:3 (v/v) com o mesmo antibiótico levofloxacino. O ácido divaricático purificado apresentou forte atividade antiviral protegendo a célula 64 vezes e 32, respectivamente da infecção viral. Conclui-se que o extrato etéreo e o ácido divaricático purificado são de grande importância para o estudo no tratamento de doenças causadas por esses microrganismos, pois inibiram o crescimento das bactérias e dos vírus testados.

Palavra-chave: agentes infecciosos, substância líquênica, tratamento antimicrobiana

1 INTRODUÇÃO

Milhões de pessoas a cada ano contraem alguma doença causada por microrganismos. Estas podem desenvolver desde infecções são das mais simples de fácil tratamento ate as mais complexas que podem levar ao óbito [1]. A forma de tratamento eficaz para estes agentes infecciosos esta cada vez mais difícil, uma vez que os microrganismos desenvolvem mecanismos de resistência a diferentes classes de drogas sintética utilizadas nos tratamentos.

Staphylococcus aureus é uma bactéria que geralmente é encontrada na pele e nas fossas nasais de pessoas saudáveis, porem podem causar desde espinhas, furúnculos, celulites, pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico, septicemia e outras. Linhagens desse microrganismo vêm desenvolvendo resistência aos antibióticos, tais como: penicilina, amoxicilina, ampicilina, metecilina, cefalosporinas, vancomicina e teicoplanina. Com relação à oxacilina, esta resistência se dá ou por mutação do gene, ou pela aquisição de genes de resistência de outras bactérias da mesma espécie [1].

Os *Enterococcus* vêm surgindo como um dos principais agentes nosocomiais e na comunidade em geral são considerados como microrganismos normais do trato intestinal, e às vezes, encontrados também no trato genital feminino e masculino. São responsáveis por causar endocardite infecciosa, bacteremia, síndromes diarreicas em recém-nascidos, infecções do trato urinário, e infecções de feridas cirúrgicas[2-4].

Com a resistência desses microrganismos as drogas já existentes, faz-se necessário a descoberta de novas drogas ou a fabricação de novos produtos sintéticos para combater esses agentes infecciosos. Neste particular destacam-se os produtos de origem natural, que são possuidores de compostos bioativos que além de diversas outras atividades biológicas, possuem grande atividade antimicrobiana. Os líquens possuem ação antimicrobiana comprovada, bem como antitumoral, antipirética, anti-inflamatória, antiviral, analgésica, e ainda produz óleos essenciais [5, 6].

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana dos extrato etéreo, clorofórmico e acetônico, e sinérgica do ácido divaricático purificado do líquen *Ramalinaaspera* em linhagens de *S. aureus* e *Enterococcus* e isolados clínicos resistentes, bem como sua atividade antiviral.

2 MATERIAS EMÉTODOS

2.1 Coleta domaterial

A *Ramalina aspera* (Räsänen) foi coletada no município de Limoeiro, agreste do Estado de Pernambuco. Uma exsicata de número 54299 foi depositada no Herbário UFP, do Departamento de Botânica, da Universidade Federal de Pernambuco. O líquen foi identificado pelas características morfológicas e químicas do talo, pela taxonomista Ms. Lourdes Buril.

2.2 Obtenção dos extratos orgânicos

Para obter os extratos orgânicos, 35 g do material liquênico foi pesado, limpo e seco em seguida, foi adicionado 300 mL de éter dietílico, para a extração utilizando o sistema de esgotamento a quente, em aparelho de Soxhlet. Após filtração do solvente o mesmo foi evaporado em banho maria em rotaevaporador a temperatura de 40°C até *secura*, e em seguida o extrato foi mantido em dessecador até peso constante para posterior cálculo de seu rendimento. O mesmo processo foi realizado com o resíduo da filtração para obter os extratos clorofórmico e acetônico, obedecendo à série eluotrópica [7].

2.3 Isolamento e purificação do ácido divaricático purificado (ACDP)

O ACDP foi obtido a partir de 1,5 g do extrato etéreo, processado anteriormente. O extrato etéreo foi redissolvido em 8 mL de clorofórmio e submetido a refluxo em banho-maria a 40 °C por 15 min [8]. A solução obtida foi mantida em repouso 3± 4 °C por 15 dias, tempo suficiente para a formação dos cristais de ácido divaricático, os quais foram filtrados em funil de fundo poroso G4 e calculado o rendimento.

2.4 Análise em cromatografia em camada delgada

Os cristais de ácido divaricático purificado, os extratos etéreo, clorofórmico e acetônico e o padrão do ácido divaricático foram submetidos à análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) em placas de sílica gel Merck F254+366, utilizando o sistema A para eluição (tolueno/ dioxano/ ácido acético 45: 12,5: 2 v/v/v). Para a revelação do cromatograma foi utilizado ácido sulfúrico a 10% para borrifar o mesmo e logo após a vaporização do revelador, o cromatograma foi aquecida a 50 °C por 5 minutos, para o aparecimento das bandas [9]. As mesmas foram identificadas através da comparação de seus fatores de retenção (R_fs) com o padrão de ácido divaricático, obtido do Laboratório de Química de Produtos Naturais da UFPE.

2.5 Confirmação da estrutura molecular do ácido divaricático purificado(ACDP)

O espectro de Infravermelho (IV) foi realizado em espectrômetro Bruker IFS66, pela técnica de pastilhas de KBr, sendo utilizada a resolução de 4.0 cm^{-1} . Para a confirmação estrutural da molécula do ácido divaricático purificado foram obtidos espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (RMN- H^1) e Ressonância Magnética Nuclear de Carbono¹³ (RMN- C^{13}), em espectrofotômetro Varian Unity Plus 300 MHz. A RMN- C^{13} foi realizada a 75 MHz e RMN- H^1 a 300 MHz utilizando DMSO- d_6 com solvente em tubos de 5 mm a temperatura ambiente [8].

2.6 Obtenção dos microrganismos

Foram utilizados, para os testes antimicrobianos os extratos orgânicos, e os microrganismos testes *B. subtilis* (UFPEDA 6633), *S. aureus* (UFPEDA 653 linhagem não resistente), *M. luteus* (UFPEDA 2255), *S. enteridis* (UFPEDA 414), *K. pneumoniae* (UFPEDA29665).

A cepa padrão UFPEDA (01) de *S. aureus* e as cepas de isolados clínicos- oxacilina-resistentes (UFPEDA 707, UFPEDA 691, UFPEDA 729, UFPEDA 676, UFPEDA728,UFPEDA 726, UFPEDA 731, UFPEDA 677, UFPEDA 733, UFPEDA 730) foram obtidos na Coleção de Cultura do Departamento de Antibióticos da UFPE.

A cepa padrão de *E. faecalis* UFPEDA 138, e as cepas de espécies de isolados clínicos *Enterococcus* spp. (UFPEDA 854, UFPEDA 853, UFPEDA 851, UFPEDA 845, UFPEDA847) foram obtidas da coleção de cultura do Departamento de Antibióticos da UFPE.

2.7 Antibióticos

Os antibióticos eritromicina, levofloxacina, oxacilina e clindamicina, meropenem (MPM), foram obtidos da farmácia escola da Universidade Federal de Pernambuco/UFPE.

2.8 Teste de difusão em meio sólido dos extratos orgânicos

Os extratos etéreo, clorofórmico e acetônico de *R. aspera* foram submetidos a testes de

atividade antimicrobiana através da metodologia de difusão em meio sólido utilizando-se discos de papel. Foram preparados discos de cada extrato, estes foram impregnados com $50\mu\text{L}^{-1}$ (1,0 mg do extrato para 1 mL de DMSO). Os ensaios foram desenvolvidos em meio Agar Müeller – Hinton, em triplicata, para as bactérias. Os microrganismos foram inoculados a concentração de 10^8 UFC/mL. As placas foram incubadas a 37°C durante 18 h [10].

Foi utilizado como padrão o ácido úsnico (USC 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), substância liquênica com reconhecida atividade antimicrobiana, e os antibióticos meropenem (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e levofloxacino (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Os resultados foram avaliados através da mensuração do halo de inibição, em mm, ao redor dos discos impregnados com as substâncias.

2.9 Biocromatografia

A biocromatografia foi desenvolvida utilizando-se o método de Homans, Fuchs [11], modificado por Costa-Filho [12]. O extrato etéreo e o ACDP, que se mostrou mais ativo nos ensaios antibacterianos, foram aplicados em placa de sílica Gel F254+366 Merck, na concentração de $1,0\text{ mg}/\text{mL}^{-1}$, e desenvolvido no sistema A de solventes, segundo a metodologia de Culberson [9]. A placa foi armazenada para a evaporação do solvente por três dias. A suspensão microbiana da bactéria mais sensível nos testes em disco foi preparada pelo método de Bauer [10]. A cromatoplaça foi colocada dentro de uma placa de Petri recebendo uma camada de meio ágar Müeller – Hinton, fundido (20 mL), previamente inoculado com $10\mu\text{g}/\text{mL}$ do microrganismo mais sensível, *B. subtilis*, sendo armazenada numa estufa a $\pm 35^\circ\text{C}$, durante 18 h em seguida foi retirada e avaliada através dos halos de inibição ao redor dos pontos aplicados do extrato etéreo e do ACDP.

2.10 Concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida(CMB)

Foi determinada a concentração mínima inibitória (CMI) segundo os critérios da Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [13], do extrato etéreo, que continha como composto majoritário o ácido divaricático, e do ACDP. Foi preparada uma suspensão da cultura bacteriana, diluída em água destilada estéril, em tubos de ensaios, ate obter uma turbidez equivalente ao tubo 0,5 da escala Marc- Farland (10^8 UFC/mL). A concentração inicial (solução-mãe) do extrato etéreo $3200\mu\text{g}/\text{mL}$ de DSMO, e do ACDP foi de $1280\mu\text{g}/\text{mL}$ de DMSO. Foram utilizadas placas de 96 poços para o teste, distribuindo $100\mu\text{L}$ do meio

líquido Muller-Hinton em cada micropoço, nas duas primeiras colunas foram realizados, respectivamente, os controles negativos (meio sem adição de microrganismos e substâncias) e positivos (meio de cultivo mais o microrganismo) e posteriormente foi adicionado mais 80 µL do meio de cultura na coluna três, e mais 20 µL das substâncias a serem testadas (extrato etéreo e o ACDP) dissolvidos em DMSO, a partir desta coluna foram feitas diluições sucessivas de 1:2, ou seja, foram retirados 100 µL da coluna 3 e adicionados na coluna 4, até a coluna 12, logo após foi adicionado 10 µL da suspensão bacteriana padronizada. As placas foram incubadas a 35 °C durante 18 h para crescimento bacteriano. O mesmo processo foi realizado para medir a concentração mínima inibitória (CMI) dos antibióticos padrões, na mesma concentração de 1280 µg/mL.

Após o período de incubação, foi adicionado 20 µL de resazurina (0,001%) aos poços como revelador da reação. As placas foram incubadas a 35°C e após 2 horas foi realizada a leitura da reação. Após a leitura e determinação da CMI, foram semeados os poços a partir de onde foi detectado a CMI até a mais alta concentração para determinar a concentração mínima bactericida (CMB), em meio ágar Müeller – Hinton, para os *S. aureus* oxacilina resistente (ORSA), e para as espécies de *Enterococcus*.

A resazurina é um corante (fenoxazin-3-ona) indicador de oxidação-redução, que tem sido utilizado na determinação da atividade antibacteriana [14]. A manutenção da cor azul nos micropoços foi interpretada como ausência de crescimento bacteriano e o desenvolvimento de cor rosa, como ocorrência de crescimento bacteriano.

2.11 Atividade sinérgica

Os ensaios de microdiluição *in vitro* da associação entre os antibióticos e o ACDP, foram realizados segundo a metodologia de Segatore [15], com modificações, no que diz respeito às combinações das substâncias. Para cada uma das soluções dos antibióticos (levofloxacino, clindamicina, eritromicina, oxacilina), foi preparada uma solução do ACDP utilizando as seguintes proporções: 5:5 (v/v) e 7:3 (v/v) obtendo-se uma concentração inicial (solução-mãe) 1280 µg/mL (Tabela 1). Utilizaram-se placas de 96 poços, o meio de cultura M.H. (ORSA) (*Enterococcus*) e as soluções bacterianas na escala de MarcFarland (5×10^8 UFC/mL), foram aplicadas da mesma forma que na CMI, diferenciando que na terceira coluna foi aplicada a mistura do ácido divaricático purificado com um antibiótico, as diluições também foram feitas igualmente a CMI, 1:2, retirando 100 µL da coluna 3 e colocando na

coluna 4, e assim foi feito ate a coluna 12. A microplaca foi incubada a 37 °C durante 18 h.

Para a leitura das placas foi utilizado o revelador resarzurina, igualmente utilizado na CMI, logo após foi semeado em meio ágar MH (ORSA) e (*Enterococcus*), para a confirmação da atividade sinérgica, os resultados foram comparados com os valores da CMI individual do ACDP e de cada um dos antibióticos.

Tabela 1. Associação das proporções do ácido divaricático purificado com os antibióticos: oxacilina, eritromicina, levofloxacino e clindamicina.

1ª associação	5% ACDP / 5% eritromicina	5% ACDP/5% oxacilina	5% ACDP/5% clindamicina	5% ACDP/5% levofloxacino
2ª associação	7% ACDP/3% eritromicina	7% ACDP/3% oxacilina	7% ACDP/3% clindamicina	7% ACDP/3% levofloxacino

3 RESULTADOS

3.1 Rendimento dos extratos orgânicos e do ácido divaricático purificado

O extrato etéreo, clorofórmio, acetônico bem como o ácido divaricático purificado apresentaram rendimento 37,7%, 5,7%, 2,2%, 2,3%, respectivamente conforme descrito na Tabela 2

Tabela 2. Rendimento dos extratos orgânicos e do ACDP..

Extratos orgânicos	Rendimento (%)
Extrato etéreo	37,7%
Extrato clorofórmico	5,7%
Extrato acetônico	2,2%
Ácido divaricático purificado	2,3%

3.2 Análise química por cromatografia em camada delgada

Os resultados da cromatografia em camada delgada (CCD) indicaram a presença do ácido divaricático nos extratos etéreo e clorofórmico de *Ramalina aspera* com valores de R_fs (0,38), semelhantes ao R_f do padrão (0,38), já que este ácido é um dos compostos principais

da espécie em estudo, Hunek, Yoshimura [16]. Outras bandas foram observadas no extrato acetônico com valores de Rfs (0,41, 0,35) próximos ao do ácido divaricático padrão, mas não foram identificadas (Figura 1). Portanto a análise em CCD indicou a presença do ACDP com Rf 0,38 obtido a partir do extrato etéreo pela comparação como o Rf do padrão (0,38), estes dados foram confirmados através das análises de IR, RMNH⁻¹ e RMNC⁻¹³, que este trata-se do ACDP.

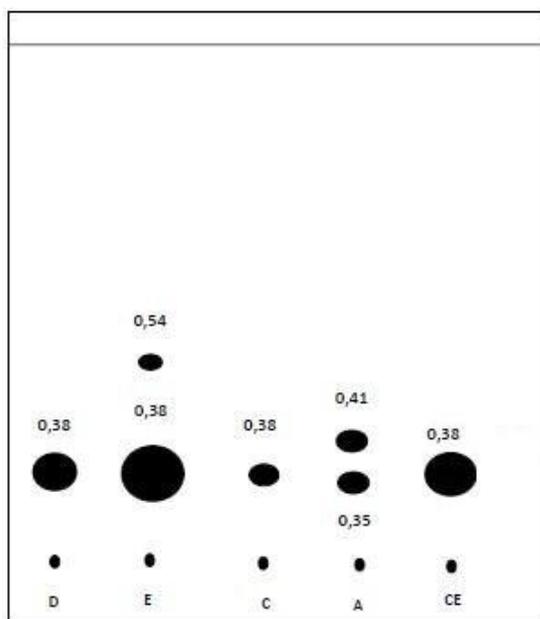


Figura 1. Cromatografia em camada delgada dos extratos orgânicos e do ACDP. D- padrão do ácido divaricático; E-extrato etéreo; C-extrato clorofórmico; A-extrato acetônico; CE-cristais do ácido divaricático purificado de *Ramalina aspera* a partir do extrato etéreo.

3.3 Confirmação da estrutura molecular do ácido divaricático purificado

IV (KBr), $\lambda_{\max.}^{\text{cm}^{-1}}$; 3574 (OH); 2872 (R-O-R); 1669 (-COOH); 1609 (Ar-COOR); 1454 a 1430 (C=C); 1296 e 1077 (bandas correspondentes ao grupo éster) (Figura 2).

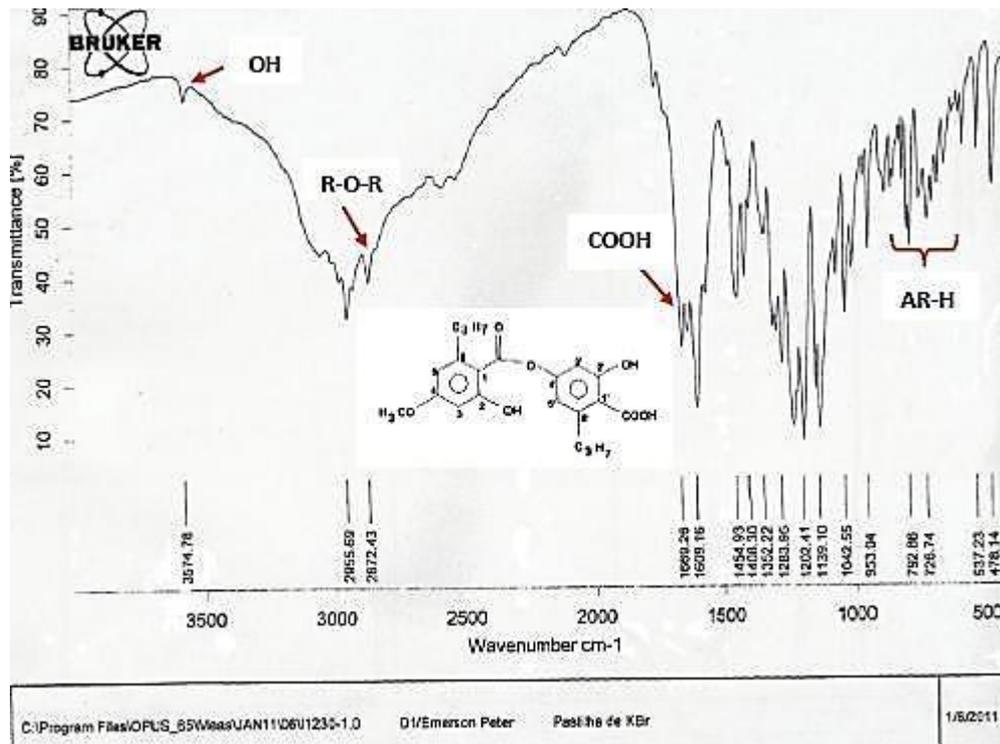


Figura 2. Espectro em Infravermelho do ACDP de *Ramalina aspera* a partir do extrato etéreo.

RMN- H^1 (300 MHz, DMSO d_6) [δ : 6,58 Hz, ($H5'd$ $J = 8$ Hz); 6,50 Hz ($H5$, d , $J = 8$ Hz); 6,35 Hz ($H3'$ e $H3'$ dd , $J=7$ H); 3,4Hz (2H, OH, s); 2,6Hz (4H, CH_2 , t); 1,6 Hz (4H, CH_2 , m) 0,9 Hz (6H, CH_3 , s) (Figura 3).

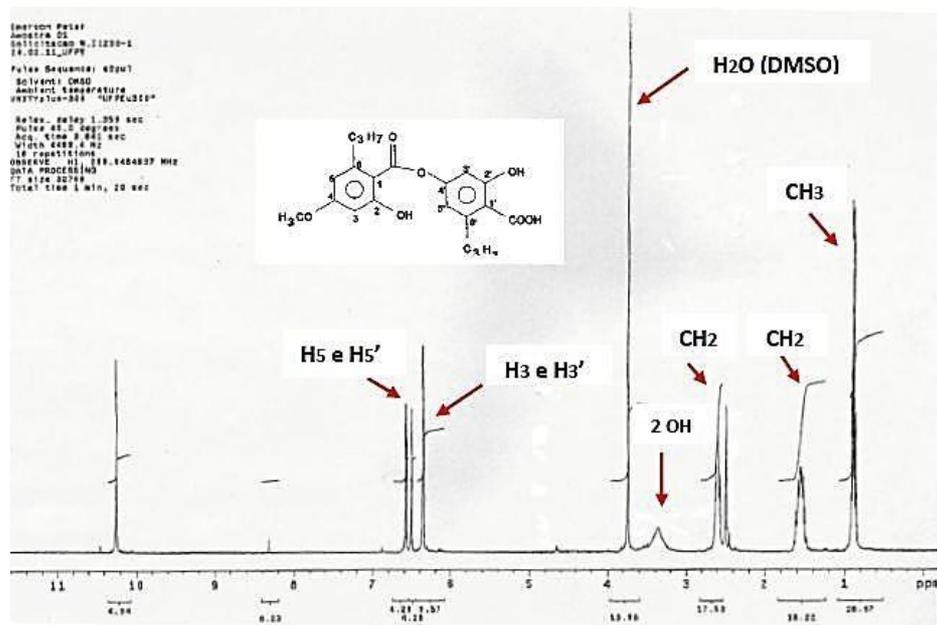


Figura 3. Espectro em Ressonância Magnética Nuclear Protônica (RMN – H^1) do ácido divaricático purificado de *Ramalina aspera* a partir do extrato etéreo.

RMN- C^{13} (70 MHz, DMSO- d_6 , δ): 23,22 (s, CH_3'); 25,2 (5, CH_3); 39,50 (S, O- CH_3); 77,0(4C, m, CH_2); 113,6 (2C, d, C5 e C5'); 126,8 (2C, d, C8 e C8'); 131,7 (2C, d, C2 e C2'); 134,1 (2C, d, C1 e C1'); 180,7 (1C, COOH) (Figura 4).

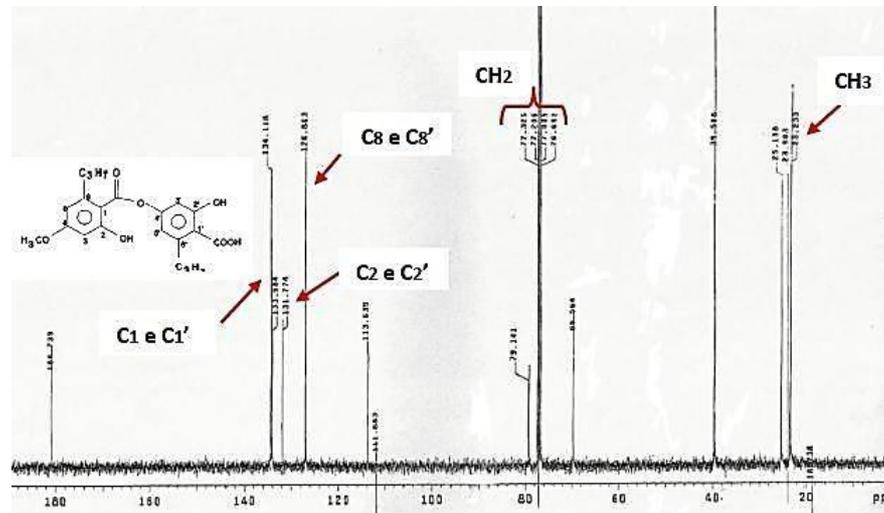


Figura 4. Espectro em Ressonância Magnética Nuclear do Carbono 13 (RMN- C^{13}) do ACDP de *Ramalina aspera* a partir do extrato etéreo.

3.4 Avaliação antibacteriana dos extratos orgânicos e ácido divaricáticopurificado

3.4.1 Teste de difusão em meio sólido dos extratos etéreo, clorofórmico e acetônico.

Os ensaios de atividade antimicrobiana revelaram atividade de todos os extratos orgânicos de *R. aspera* frente ao *B. subtilis*, *S. aureus* e *K. pneumoniae*. Entretanto os extratos etéreo e clorofórmico foram os mais ativos com halos de inibição de: 25 mm para *B. subtilis* e 17 mm para *S. aureus* e 21 mm para *B. subtilis* e 8 mm para *S. aureus*, respectivamente, e o extrato acetônico com halo de inibição de 14 mm para *B. subtilis* e 9 mm para *K. pneumoniae*. O extrato etéreo mostrou-se ainda mais ativo que o padrão de ácido úsnico contra a espécie de *B. subtilis* (Tabela 3). Uma vez que os resultados de CCD apresentaram como principal componente encontrado nos extratos etéreo e clorofórmico o ácido divaricático é provável que seja o composto responsável pela atividade observada.

Tabela 3. Teste de difusão em meio sólido dos extratos etéreo, clorofórmico e acetônico de *Ramalina aspera*. Concentração de 1,0 mg/ml em DMSO. LEVO: levofloxacino, USN: ácido usnico, MERO: meropenem. *: melhores halos de inibição.

MICROORGANISMO	EXTRATOS			PADROES		
	ETEREO MERO	CLOROFÓRMICO	ACETÔNICO	LEVO	USN	
<i>B. subtilis</i>	25*	21*	14*	38	17	47
<i>S. enteridis</i>	-	-	-	34	-	-
<i>M. luteus</i>	-	-	-	33	-	32
<i>K. pneumoniae</i>	-	8	9*	29	-	32
<i>S. aureus</i>	17*	8	9	27	10	46

3.4.2 Avaliação do biocromatograma

Por apresentar um melhor halo de inibição contra o *B. subtilis*, o extrato etéreo foi submetido a biocromatograma os resultados mostram um halo de inibição contornando a banda correspondente ao ACDP e um composto ainda não identificado o que indica uma possível ação antimicrobiana sinérgica entre estes compostos (Figura 5). A concentração utilizada foi de 1,0 mg/mL⁻¹.

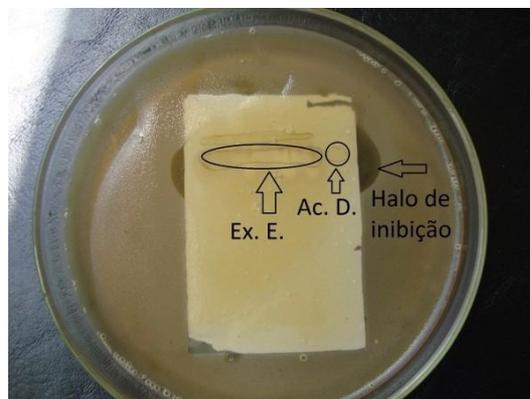


Figura 5. Biocromatograma de extrato etéreo de *Ramalina aspera* utilizando-se *Bacillus subtilis*. Ex. E.- extrato etéreo, D.- Ácido divaricático purificado, Halo de inibição. Fonte: autor, 2011.

3.5 Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) do extrato etéreo e do ácido divaricático purificado (ACDP)

Verificou-se no ensaio da determinação da CMI, que o extrato etéreo foi mais ativo frente aos microrganismos *B. subtilis* (40 µg/mL) e *S. aureus* (320 µg/mL), e a CMB foi de 80 µg/mL para *B. subtilis* e de 320 µg/mL para *S. aureus*.

A partir dos resultados da CMI do extrato etéreo para *S. aureus*, foram selecionados

11 linhagens de *S. aureus* oxacilina-resistente (ORSA) sendo 1 padrão UFPEDA 01, bem como 6 linhagens de *Enterococcus* spp. sendo 1 padrão *E. Faecalis* UFPEDA 138 para fazer os ensaios de CMI do ACDP. Tanto os isolados clínicos de ORSA como os de *Enterococcus* spp. foram obtidos da Coleção de Cultura do Departamento de Antibióticos da UFPE. Para todas as linhagens de isolados clínicos ORSA houve uma CMI de 128 µg/ml com exceção das CMI obtidas contra as linhagens ORSA UFPEDA 728 e UFPEDA 726 (32 µg/mL) do ACDP, para os *Enterococcus* spp. os valores de CMI diferenciaram para cada linhagem (tabela 4), sendo que a melhor CMI encontrada foi para as linhagens UFPEDA 854, UFPEDA 847 (8 µg/mL), e os valores de CMBs tanto para as espécies ORSA quanto para as de *Enterococcus* spp. foram maiores que 128 µg/mL.

Tabela 4. CMI e CMB do ácido divaricático purificado frente as espécies de *Enterococcus* spp.. Concentração inicial 1280 µg/mL. (*) melhores CMI.

Linhagens de <i>Enterococcus</i> spp.	CMI µg/mL	CMB µg/MI
854*	8	>128
853	16	>128
851	32	>128
845	16	>128
847*	8	>128
138	32	>128

Os valores de CMI de *Enterococcus* spp. foram melhores do que aqueles encontrados para a CMI do ACDP frente as linhagens ORSA, e melhores que aqueles encontrados na literatura. Foram escolhidos dois microrganismos, um padrão (UFPEDA 138) e um isolado clínico (UFPEDA 854) de *Enterococcus* spp., e um isolado clínico ORSA (UFPEDA 728) e um padrão (UFPEDA 01) por se tratar de duas linhagens de respostas diferentes, para fazer a atividade sinérgica entre o ACDP e os antibióticos comerciais. Os antibióticos comerciais eritromicina, levofloxacino, clindamicina, oxacilina, foram submetidos a CMI frente aos microrganismos citados a cima, para a comparação das CMIs e CMBs. Os valores de CMI dos antibióticos para as espécies ORSA foram de 128 µg/mL para as duas linhagens, com exceção do antibiótico oxacilina que a CMI provavelmente está numa concentração maior que 128 µg/mL, os valores de CMBs também foram iguais para todos os antibióticos (128 µg/mL). Já as CMIs encontradas para as espécies de *Enterococcus* spp. diferenciaram para cada antibiótico, os valores de CMB foram iguais para todas as linhagens testadas (128 µg/mL) com exceção da CMB do antibiótico levofloxacino que foi de 64 µg/mL.

É possível afirmar que as CMIs do ACDP e dos antibióticos comerciais não

diferenciaram, com exceção da CMI do antibiótico oxacilina para a linhagem padrão ORSAUFPEDA 01 que foi $>128 \mu\text{g/mL}$, sendo que na CMI do ACDP o valor foi de $128 \mu\text{g/mL}$, e o isolado clínico UFPEDA 728 ORSA na CMI do ACDP o valor foi de $32 \mu\text{g/mL}$ e na CMI do antibiótico oxacilina o valor foi $>128 \mu\text{g/mL}$, o que mostra que o ACDP foi mais ativo que o antibiótico oxacilina, as CMBs dos antibióticos também não se diferenciaram das CMBs do ACDP, mostrando que não houve morte e sim inibição de 50% do microrganismo. Comparando as tabelas 4 e tabela 5 observa-se que os valores de CMI e CMB do ACDP foram maiores que os valores de CMI e CMB dos antibióticos comerciais para a linhagem de isolado clínico UFPEDA 854 e linhagem padrão UFPEDA 138 de *Enterococcus faecalis*, com exceção das CMBs do antibiótico levofloxacino, que teve uma CMB de $64 \mu\text{g/mL}$ para ambas as linhagens.

Tabela 5. CMI e CMB dos antibióticos padrões para as linhagens UFPEDA 854 e UFPEDA 138 de *Enterococcus faecalis*. Concentração inicial de $1280 \mu\text{g/MI}$.

<i>Enterococcus</i> sp.	ERITRO		LEVO		OXA		CLINDA	
CMI $\mu\text{g/mL}$	CMB $\mu\text{g/mL}$	CMI $\mu\text{g/mL}$	CMB $\mu\text{g/mL}$	CMI $\mu\text{g/mL}$	CMB $\mu\text{g/mL}$	CMI $\mu\text{g/mL}$	CMB $\mu\text{g/MI}$	
854	5	128	2	64	2	>128	16	128
138	>128	>128	1	64	16	>128	>128	>128

3.6 Atividade sinérgica

A associação na proporção de 7:3 (v/v) do ACDP com o antibiótico levofloxacino, respectivamente, levou a uma interação das substâncias utilizadas frente à linhagem padrão UFPEDA 138 de *E. faecalis*, ocorrendo assim um efeito sinérgico, já na proporção 5:5 (v/v) do antibiótico e do ACDP ocorreu uma diminuição na ação do ACDP, comparado ao valor de CMI sozinho, sendo assim um efeito antagônico. O efeito antagônico pode ser observado, também, na associação do ACDP com o antibiótico clindamicina e eritromicina, tanto na proporção 7: 3 (v/v), quanto para a proporção 5:5 (v/v). Estes resultados podem ser observados na tabela 6.

Tabela 6. Ensaio sinérgico do ácido divaricático purificado (ACDP) com os antibióticos oxacilina, levofloxacino, clindamicina e eritromicina para linhagem padrão UFPEDA 138 de *Enterococcus faecalis* e isolado clínico de *Enterococcus spp* UFPEDA 854.

Padrão UFPEDA 138	ACDP/ OXA (µg/mL)	ACDP/ LEVO (µg/mL)	ACDP/ CLINDA (µg/mL)	ACDP/ ERITRO (µg/mL)
Proporção 7:3	antagonismo (>128)	sinergismo (4)	Antagônico (>128)	Antagônico (>128)
Proporção 5:5	agonismo (>128)	agônico (32)	itagônico (>128)	itagônico (>128)
Isolado clínico UFPEDA 854				
Proporção 7:3	agonismo (>128)	Não houve interação (8)	tagonismo (>128)	tagônico (>32)
Proporção 5:5	agonismo (>128)	Não houve interação (8)	tagonismo (>128)	itagônico (>128)

Na tabela 6, não pode ser observado interação para a linhagem UFPEDA 854, tanto na proporção 7:3 (v/v) quanto para a proporção 5:5 (v/v) na associação do ACDP, com o antibiótico levofloxacino, o aumento da ação do composto liquênico comparado ao valor de CMI sozinho. Já para a associação com os antibióticos eritromicina, clindamicina e oxacilina houve efeito antagônico, nas duas proporções.

Tabela 7. Ensaio sinérgico do ACDP com os antibióticos: oxacilina, levofloxacino, clindamicina e eritromicina frente a linhagem padrão UFPEDA 01 *Staphylococcus aureus* oxacilina resistente e isolado clínico UFPEDA 728ORSA.

Padrão <i>S. aureus</i> oxacilina resistente 01	ACDP/OXA (µg/mL)	ACDP/LEVO (µg/mL)	ACDP/CLINDA (µg/mL)	ACDP/ERITRO (µg/mL)
Proporção 7:3	Antagonismo (>128)	Sinergismo (8)	Antagonismo (>128)	Antagonismo (>128)
Proporções 5:5	Antagonismo (>128)	sinergismo (4)	Antagonismo (>128)	Antagonismo (>128)
Isolado clínico UFPEDA 728				
Proporção 7:3	Antagonismo (>128)	Sinergismo (16)	Antagonismo (>128)	Antagonismo (>128)
	Antagonismo (>128)	Sinergismo (16)	Antagonismo (>128)	Antagonismo (>128)

A tabela 7 mostra que houve sinergismo na combinação do antibiótico levofloxacino com o ACDP, tanto para a proporção 7:3 (v/v) quanto para a 5:5 (v/v) para as duas linhagens de *Staphylococcus aureus* oxacilina resistente, mostrando assim a eficiência da combinação dos compostos.

3.7 Análise estatística

Para a confiabilidade dos resultados teste de CMI e atividade de sinergismo foi feito análises estatística utilizando o teste t, onde pode ser visto que não houve significância nos resultados encontrados, com 95% de confiabilidade, que são mostrados nas tabelas 8 e 9.

Tabela 8. Teste t para comparação das CMIs das duas linhagens de *Enterococcus*. Nível de confiabilidade 95%.

Comparação das CMIs	P= 0,05 (nível de confiabilidade)
ACDP vs eritromicina	0,575008
ACDP vs oxacilina	0,489515
ACDP vs levofloxacino	0,206537
ACDP vs clindamicina	0,467891

Tabela 9. Teste t para a atividade sinérgica das espécies de *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus spp.* Nível de confiabilidade 95%.

Proporções	P=0,05 (nível de confiabilidade)			
	138	854	01	728
50:50 vs 70:30	0,857355	0, 883768	0,674557	0,386700

Também foi feito um teste de similaridade onde se observa a distancia euclidiana entre o ACDP e os antibióticos, onde mostra que o ACDP, o oxacilina e o levofloxacina estão no mesmo grupo de ação antibiótica (Figura 6).

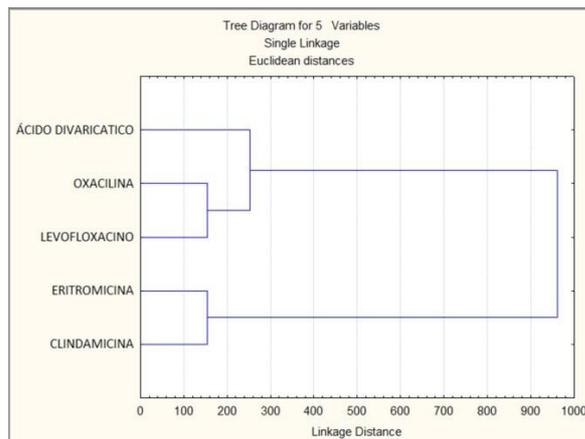


Figura 6. Teste de similaridade entre os ácido divaricático e os antibióticos padrões,

4 DISCUSSÃO

Os extratos etéreo, clorofórmico e acetônico de *Ramalina solediosa* testados, confirmaram que os extratos etéreo e clorofórmico foram ativos frente aos microrganismos:

B. subtilis e *S. aureus*, sendo o extrato etéreo com maior atividade para o *B. subtilis* apresentando halo de inibição de 16,7 mm, no extrato total foi encontrada a presença de ácido úsnico que é o responsável pela atividade antibacteriana encontrada [17].

Os extratos acetônico, metanólico e etanólico de *Usnea ghattensis* G. Awasthi (Usneaceae) foram testados quanto a sua ação antibiótica e mostrou que o extrato etanólico foi mais eficaz contra *B. cereus* e *P. aeruginosa* com uma zona de inibição de $29,8 \pm 0,6$ mm e $12,3 \pm 0,5$ mm, a uma concentração de 0,2 mg/mL. Os extratos acetônico e metanólico demonstraram atividade quase semelhante contra o *S. aureus* com uma zona de inibição de $24,6$

$\pm 0,5$ mm e $24,7 \pm 0,4$ mm. Apenas o extrato metanólico mostrou atividade contra *S. faecalis* com uma zona de $\pm 13,5$ 0,8 mm [18].

Comparando com os dados encontrados na literatura em estudos com uma espécie da mesma família, Ramalinaceae [17] é possível afirmar que os extratos orgânicos de *R. aspera* tem ação bacteriostática frente aos microrganismos testados, que a zona de inibição encontrada (25 mm, 21 mm e 14 mm para *B. subtilis*, e 17 mm para *S. aureus* do extrato etéreo, clorofórmico e acetônico) se assemelha aos da literatura.

Falcão [17], ainda observou, na biocromatografia dos extratos de *R. solediosa* um possível efeito sinérgico entre os componentes dos extratos etéreo e clorofórmico quando testados com *B. subtilis*, sendo o maior halo de inibição observado no extrato etéreo que

contem o ácido úsnico quando comparado ao extrato clorofórmico. Falcão [19], utilizando os extratos orgânicos clorofórmico e etéreo de *Heterodermia leucomela* realizou um biocromatograma com os microrganismos *B. subtilis* e *S. aureus*, e foi observado halos de inibição também ao redor das bandas que correspondem a atranorina e zeorina presentes no extrato etéreo.

Kosanic et al. [20] verificaram que a CMI para o extrato metanólico de *Lecanora frustulosa* que continha ácido divaricático foi de 780 µg/mL para *B. mycooides*, *Enterobacter cloacae*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, de 1560 µg/mL contra *B. subtilis*, e a Concentração mínima fungicida (CMF) foi de 3120 µg/mL, para fungos *Botrytis cinerea* e *Trichoderma harzianum*, e uma CMF de 12500 µg/mL contra os fungos *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium oxysporum*, *Mucor mucedo*, e uma CMF de 6250 µg/mL contra os fungos *Candida albicans*, *Paecilomyces variotii*. O extrato acetônico teve uma CMI de 1560 µg/mL para as bactérias *B. mycooides*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, uma CMI de 3120 µg/mL para *B. subtilis* e uma CMF de 12500 µg/mL para *B. cinerrea* e *P. variotii*. Esses dados mostram que no presente trabalho foi encontrado um valor de CMI do extrato etéreo melhor do que os dados descritos na literatura.

Os ácidos evernico do líquen *Evernia prunastri* e fisódico de *Pseudoevernia furfuraceae* foram isolados e avaliados quanto a ação antimicrobiana através da CMI frente aos microrganismos, que variou de 250 µg/mL frente as bactérias *B. subtilis*, *B. mycooides*, *K. pneumoniae*, e 3,12µg/mL frente a bactéria *S. aureus*, respectivamente [21].

Rankovic'et al, [22] avaliaram a CMI da atranorina frente aos microrganismos *B. subtilis*(15 µg/ml), *K. pneumoniae* e *A. fumigatos* (500 µg/mL), *S. aureus* e *C. albicans* (250 µg/mL), *E. coli*, *Aspergillus flavus*, *Ptisana purpurescens*, *Penicillum verrucosum* (1000 µg/ml).

O extrato hidroalcoólico e frações de acetato de etila, ciclohexano, n-butanoni de *Pityrocarpa moniliformis* foram testados na combinação com os antibióticos: eritromicina, estreptomicina, tetraciclina, e clorafenicol contra *S. aureus*, o extrato bruto apresentou efeito sinérgico ou aditivo com tetraciclina contra todas as cepas, enquanto a fração de ciclohexano mostrou com tetraciclina e eritromicina. Já a fração butanólica mostrou efeito sinérgico ou aditivo com toda droga testada, o que pode ser explicado pela presença de saponina, que pode causar a permeabilização da membrana [23].

Agbok, [24] testou a combinação entre extrato metanólico do líquen *Ramalina farinacea* e o antibiótico comercial ampicilina, em linhagens de isolados clínicos de *S. aureus* A e B, na concentração de 800 µg/mL, e observou que nas proporções 9:1, 8:2, 6:4, 05:05,

04:06, 03:07 v/v houve sinergismo, enquanto em proporções 07:03, 02:08 e 01:09 v/v foi aditivo, e que a combinação do extrato metanólico e ampicilina contra *S. aureus* cepa B foi de 100% sinérgico. Segatore, [15] testou a combinação do ácido úsnico com os antibióticos: gentamicina, levofloxacino, eritromicina, clindamicina, oxacilina, em cinco linhagens de *S. aureus* metilicina resistente, e como respostas observou-se uma ação sinérgica na combinação com gentamicina, enquanto que houve um antagonismo com a levofloxacina. A combinação com eritromicina mostrou indiferença, enquanto a variabilidade foi observada para clindamicina e oxacilina.

5. CONCLUSÃO

Os extratos etéreo, clorofórmico e acetônico tem atividade frente às bactérias testadas, sendo o extrato etéreo o que teve uma maior atividade frente ao microrganismo *B. subtilis*. O ácido divaricático purificado mostrou uma melhor CMI para as espécies de *Enterococcus* sp., do que aquelas mostradas para as espécies de ORSA. A combinação do ácido divaricático purificado com levofloxacino na proporção de 7:3 (v/v) houve sinergismo para a linhagem padrão UFPEDA 138 de *Enterococcus faecalis*, e para a linhagem de isolado clínico UFPEDA 854 nas proporções de 7:3 (v/v) e 5:5 (v/v) não pode ser visto interação das duas substâncias com o mesmo antibiótico, já para as espécies de ORSA houve sinergismo na combinação com o levofloxacino nas duas proporções. É importante o uso da combinação de drogas para evitar a resistência de bactérias que vem surgindo, para conseguir uma maior eficácia para o tratamento de doenças e infecções causadas por esses agentes. A análise estatística mostrou 95% de confiabilidade dos resultados.

REFERÊNCIA

- [1] SANTOS DOS, A. L.; SANTOS, D. L.; FREITAS DE, C. C.; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 43, n 6 pag: 413-423. 2007.
- [2] BENDER, A. E., FREITAS, P. L. A., BARTH, L. A., **Avaliação da suscetibilidade antimicrobiana de *Enterococcus* spp. Isolados em dois hospitais de Porto Alegre – RS, Brasil.** **RBAC**, v. 42, n.1, p. 15-19,2010.
- [3] ASLANGUL, E.; RUIMY, R.; CHAU, F.; GARRY, L.; ANDREMONT, A.; FANTIN, B. Relationship between the Level of Acquired Resistance to Gentamicin and Synergism with Amoxicillin in *Enterococcus faecalis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 10, p. 4144–4148, 2005.
- [4] DESHPANDE, L. M.; FRITSCH, T. R.; MOET, G. J.; BIEDENBACH, D. J.; JONES, R. N. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococci* from North America and Europe: a report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 58, p. 163-170, 2007.
- [5] RIBEIRO, S.M.; PEREIRA, E.C.; SILVA, N.H.; FALCÃO, E.P.S.; GUSMÃO, N.B.; HONDA, N.K. &QUILHOT, W. Detection of antibacterial activity of lichen substances through microdilution tests. Pp. 187-194. In: Calvelo, S. & Feuerer, T. (Org.). **Lichenology in Latin America II**. Hamburg, Mitt. Inst. Allg. Bot. Hamburg.2002.
- [6] MANOJLOVIC, NEDELJKO T. ; VASILJEVIC, PERICA J.; MASKOVIC, PAVLE Z.; JUSKOVIC, M.; BOGDANOVIC-DUSANOVIC, GORDANA. Chemical Composition, Antioxidant, and Antimicrobial Activities of Lichen Umbilicaria cylindrica (L.) Delise (Umbilicariaceae). v. 2012, **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**.
- [8] ASAHINA, Y.; SHIBATA, S. Chemistry of lichen substances, **Japan Society for the Promotion of Science**, Tokio, p. 1954. 2240.
- [9] CULBERSON, C.F. Improved conditions and new data for the identification of lichen products by a standardized thin layer-chromatographic method. **Journal of Chromatography. Holanda**, v. 72, n. 1, p. 113-125. out.1972.
- [10] BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.;SHERRIS, J.C. & TRUCK, M. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. **The American Journal of Clinical Pathology** v. 45(4): 493-496,1966.
- [11] HOMANS, A.L. & FUCHS, A. Direct bioautography on thin layer, Cromatograms as method for detecting fungitoxic substances. **Journal of Cromatography** v.51, p. 327-329. 1970.
- [12] COSTA-FILHO, L. Atividade antimicrobiana de substâncias Liquênicas. Monografia

Bacharelado. Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pernambuco, Recife –PE. Brasil. p. 1-61

[13] CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). “Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (21st edn) Wayne: M100-S21”, **Clinical and Laboratory Standards Institute**. 2011.

[14] MONTEJANO, H. A.; GERVALDO, M.; BERTOLOTTI, S. G. The excited states quenching of resazurin and resorufin and resorufin by p- benzoquinones in polar solvents. **Dyes and Pigments**, v. 64, p. 117-124,2005.

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

[16] HUNNEK, S.; I. YOSHIMURA. Identification of lichen substances. Springer Verlag, Berlin. p.1-504.

[17] FALCÃO, S. P. E. DA, SILVA, H., N. DA, GUSMÃO, B. N. RIBEIRO, M. S. PEREIRA, C. E. Atividade antimicrobiana de derivados fenólicos do líquen *Ramalina sorediosa* (B. de Lesd.) Laundron. **Acta Botanica Brasiliense**. v. 18, n.4, p. 911- 918,2004.

[18] SRIVASTAVA, P. UPRETI, D.K.; SRIVASTAVA, A.K.; NAYAK, M.T.; Antimicrobial Property of Extracts of Indian Lichen against Human Pathogenic Bacteria. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**. v. 2013, p. 6.2013.

[19] FALCAO, E. P da S.; SILVA, N. H. da.; GUSMÃO, N. B.; RIBEIRO, S. M.; HONDA, N.K.; PEREIRA, E. C. Atividade antimicrobiana de compostos fenólicos do líquen *Heterodermia leucomela* (L.) Poelt. **Acta farmacêutica bonaerense**. v. 21, p. 43-49,2002.

[20] KOSANIC, MARIJANA, BRANISLAV, R., SLOBODAN, S. Antimicrobial activity of de Lichen *Lecanora frustulosa* and *Parmeliopsis hyperopta* and their divaricatic acid and zeorin constituents. **African Journal of Microbiologyc Research**, v. 4, n. 9, p. 885- 890, 2010.

[21] KOSANIC', M.; MANOJLOVIC', N.; JANKOVIC', S.; STANOJKOVIC', T.; RANKOVIC', B. *Evernia prunastri* and *Pseudoevernia furfuraceae* lichens and their major metabolites as antioxidant, antimicrobial and anticancer agents. **Food and Chemical Toxicology**. v. 53, p. 112–118.2013.

[22] RANKOVIC', B.; MARIJANA KOSANIC', M.; MANOJLOVIC', N.; RANKOVIC', A.; STANOJKOVIC, T. Chemical composition of *Hypogymnia physodes* lichen and biological activities of some its major metabolites. **Medicinal Chemistry Research**. v. 23: p. 408–416. 2014.

[23] SILVA, J. F.V.; SILVA, L.C.N.; ARRUDA, I.R. DE S.; SILVA, A.G DA.; MACEDO, A.J.; ARAUJO, J.M.; CORREIA, M. T. DO S.; SILVA, M.V. Antimicrobial activity of *Pityrocarpa moniliformis* leaves and its capacity to enhance the activity of four antibiotics

against *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of Medicinal Plants Research**. v. 7(28), p. 2067-2072, 2013.

[24] AGBOKE, A. A.; ESIMONE, C. O.; ATTAMA, A. A.; MOHMOH, M. A. In vitro evaluation of the interaction between methanol extract of the lichen, *Ramalina farinacea* and ampicillin against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of phytomedicine research** . v. 2, p. 35-39.2011.

6. CONCLUSÃO

- O extrato etéreo foi ativo frente a bactéria *B. subtilis* e *S. aureus*;
- O ácido divaricático purificado teve uma melhor CMI as espécies de
- *Enterococcus*, e para duas linhagens de isolado clínicos de *S. aureus* oxacilina – resistente;
- Os testes de sinergismo mostraram que o ácido divaricático purificado na
- combinação com o levofloxacino na proporção 7:3 melhorou sua ação antibiótica para a
- linhagem de *Enterococcus faecalis* UFPEDA 138;
- Houve sinergismo na combinação do ácido divaricático purificado como
- levofloxacino nas duas proporções para os ORSA;
- O ácido divaricático purificado foi ativo contra os vírus do sarampo e influenza
- H1N1;
- O ácido divaricático é um composto bastante promissor para o combate
- microrganismos infecciosos.

ANEXO A - RELATÓRIO TESTES ANTIVIRAIS

1. MATERIAIS E MÉTODOS

1.2. DETERMINAÇÃO DO TÍTULO VIRAL

1.2.1. Cultura de células L929, VERO E MDCK

Foram utilizadas para os testes as células L929, MDCK e VERO, que foram cultivadas a 37°C, em placas de cultura de 96 escavações contendo 100µL de meio Leibovitz 15, suplementado com 10% de soro fetal bovino (para as células VERO E L929) e 5% (para as células MDCK), e 1% (v/v) de penicilina e 0,5% deanfotericina.

1.2.2. Vírus e infecção celular

Foram utilizados para avaliar ação antiviral dos compostos liquenicos, os vírus E. M. C (encéfalo miocardite), H1N1 (influenza), e Sarampo, as células L929, MDCK e VERO foram infectadas com os respectivos vírus, após o período de inoculação em placas de 96 poços. As células e os vírus foram obtidos do Laboratório de Parasitologia e Malacologia do Instituto Butantan, na cidade de São Paulo.

1.2.3. Preparação das amostras

A princípio a concentração utilizada, do extrato etéreo da *Ramalina aspera* foi de 15mg, diluídos em 250µl de DMSO, e do ácido divaricático (purificado a partir do extrato etéreo) 20mg/ml de DMSO. Foram adicionados 100µl de cada um destes extratos as microplacas.

1.2.4. Separação por peso molecular do Extrato etéreo e do ácido divaricático purificado por Cromatografia Utilizando Coluna De Gel Filtração

O extrato etéreo da *Ramalina aspera*, foi submetido a uma cromatografia de coluna de gel filtração para a separação de substâncias por peso molecular, equipado com uma Coluna superdex 75, a um volume de injeção de 500µl, utilizando como tampão de eluição o Tris-HCl (20 mM). A leitura na cromatografia foi realizada a 214, 254 e 280 nm para identificar os peptídeos, nucleotídeos, e proteínas, respectivamente. Foram coletadas frações de 1ml/min.

O ácido divaricático, também, foi submetido à cromatografia de coluna de gel filtração, equipado com uma coluna superdex 75, para a separação de substâncias por peso molecular, a um volume de injeção de 100 µl, com um fluxo de corrida de 0,5ml/1min, numa concentração de 20mg/ml de DMSO. Foi utilizado como tampão o fosfato de sódio a 0,1M, com pH 7.0. As leituras foram feitas no mesmo comprimento de onda utilizado para a leitura do extrato etéreo. Foram coletados cinco tubos de ensaios com frações separadas. Esses tubos foram numerados para melhor identificação.

Todas as frações coletadas, tanto do extrato etéreo como do ácido divaricático foram submetidas a testes antivirais.

Estas análises foram feitas no equipamento Akta Purifier – GE, coluna Supherdex 75 10/300 GI, Amersham Pharmacia Biotech.

1.2.5. Análise em SDS-PAGE em gel depoliacrilamida

Para identificar o peso molecular das frações dos extratos e do ácido divaricático, separados na cromatografia, foi feita uma análise em SDS-PAGE em gel de poliacrilamida. Foram utilizados os padrões de proteínas a partir do kit marcador LMW- SDS (Amersham Pharmacia Biotech). A eletroforese foi realizada a 50 mA para 90min. O gel foi corado com Gel Code Blue Stain Reagent (Pierce, Rockford, IL). O SDS confere carga negativa às proteínas, facilitando a separação por peso molecular, essa mobilidade esta relacionada diretamente ao tamanho da proteína.

1.2.6. Gel Bidimensional

Foi feita uma eletroforese bidimensional em gel, com o ácido divaricático para separar por pontos isoelétricos as moléculas encontradas na composição do composto. Essa técnica separa as proteínas em duas dimensões. A primeira fase as proteínas são separadas por diferenças do ponto isoelétricas, sendo chamada de focalização isoelétrica (IEF), onde a amostra é aplicada em uma fita gelatinosa que possui um gradiente de pH e em seguida, é submetida a um potencial elétrico. A segunda etapa consiste em separação das substâncias por peso de massa molecular, onde a fita gelatinosa é colocada em um gel (SDS-PAGE), permitindo a migração das proteínas pelogel.

1.2.7. Titulação viral

O vírus da encefalomiocardite, EMC (título inicial de 10^5 TCID₅₀) foi aplicado nestas microplacas em diluições seriadas com razão 2. As microplacas contendo as células L929, MDCK, e VERO foram incubadas por 48 horas, 72 horas e 120 horas, respectivamente, em estufa a 37 °C, e o efeito citopático ocasionado pelos vírus foram determinados em cada escavação por observação ao microscópio ótico, todos os dias, seguindo a metodologia descrita por Greco et al, 2009. As células e os vírus foram obtidos do Laboratório de Parasitologia e Malacologia do Instituto Butantan, na cidade de São Paulo.

1.3 TESTES DECITOTOXIDADE:

Uma nova placa foi feita para encontrar uma concentração que não prejudicasse as células, então 100 µl do meio contendo a cultura de célula L929 foi adicionada em cada poço de uma placa de 96 escavações. 100 µl de cada amostra foram adicionadas no primeiro poço de cada coluna, totalizando um volume de 200 µl final. Após isso 100µl desta mistura foi passada subsequentemente aos demais poços de forma a diluir o extrato (razão 2). As placas foram observadas após 24 horas de forma a determinar a ação tóxica das diferentes diluições dos extratos nas células.

1. RESULTADOS

1.1. Titulação viral

Observou-se que na concentração de 60mg/ml do extrato etéreo, as células sofreram modificações, aparentemente no processo de morte celular, e possível ação antiviral. A partir daí foi decidido fazer um teste de citotoxicidade para encontrar uma concentração não tóxica à célula, porém tóxica ao vírus. Esimone et al., 2007, avaliou a ação antiviral do líquen *Parmelia perlata*, e observou que as frações polissacarídicas brutas, encontradas no líquen, possuem atividade contra o vírus da febre amarela com uma IC₅₀ de 15µg/ml.

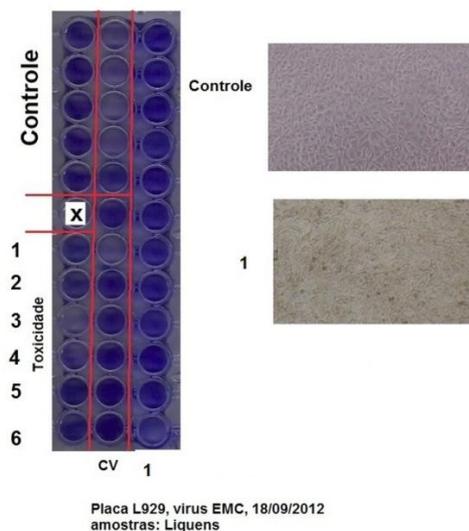


Figura 1. Placa de titulação viral. CV- controle do vírus; 1- Extrato etéreo de *R. aspera*.

O ácido divaricático e as frações separadas pela cromatografia de gel filtração foram submetidos a ensaios antivirais. O ácido divaricático protegeu a célula MDCK em até 64 vezes contra a ação do vírus H1N1, e a fração, nomeada como 19, protegeu em 8 vezes a célula infectada (Figura 2). Não houve ação contra o vírus do sarampo.

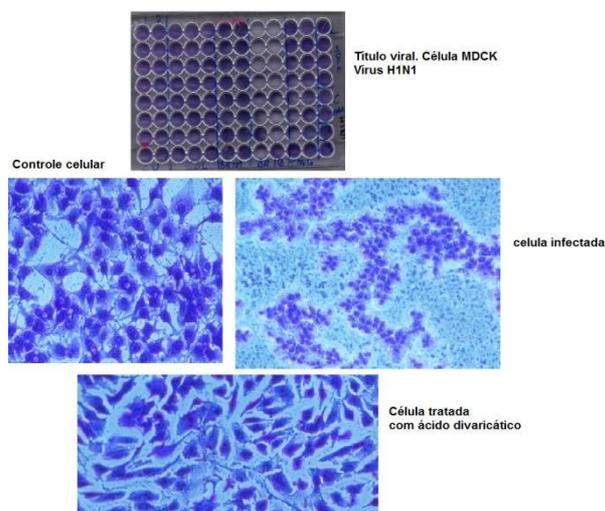


Figura 2. Titulação viral do ácido divaricático. Célula MDCK. Vírus H1N1.

1.2. Teste de Citotoxicidade

O teste de citotoxicidade, com concentração inicial de 40mg/ml, mostrou que a partir da concentração $7,81 \times 10^{-2}$ as células não sofreram nenhum dano nas concentrações testadas (Figura 3).

Citotoxicidade L929 25 09 2012

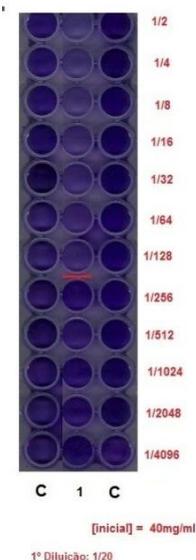


Figura 3. Teste de citotoxicidade. C- controle; 1- Extrato etéreo a frio de *R. aspera*.

1.3. Titulação viral após o teste de citotoxicidade

Após o teste de citotoxicidade, foi realizada, novamente, outra placa para avaliar a titulação viral do extrato etéreo. Depois de observar o resultado, é possível dizer que a ação antiviral do extrato etéreo, provavelmente, esteja em uma concentração tóxica à célula (Figura 3).

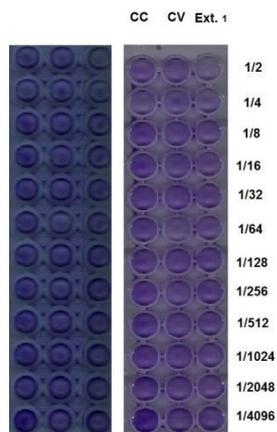


Figura 4. Placa de titulação viral após o teste de citotoxicidade. Vírus EMC.

1.4. SEPARAÇÃO POR PESO MOLECULAR DO EXTRATO ETÉREO E DO ÁCIDO DIVARICÁTICO PURIFICADO POR CROMATOGRAFIA UTILIZANDO COLUNA DE GELFILTRAÇÃO

A cromatografia por Gel Filtração foi utilizada para fazer a separação das substâncias que compõem o extrato e o ácido divaricático purificado por peso molecular. Comparando-se

os dois gráficos, observa-se que há diferenças na composição do extrato e do ácido divaricático purificado. No gráfico do extrato foi possível ler nos comprimentos de onda 214, 254 e 280 nm, peptídeos, nucleotídeos, e proteínas, respectivamente (Figura 5).

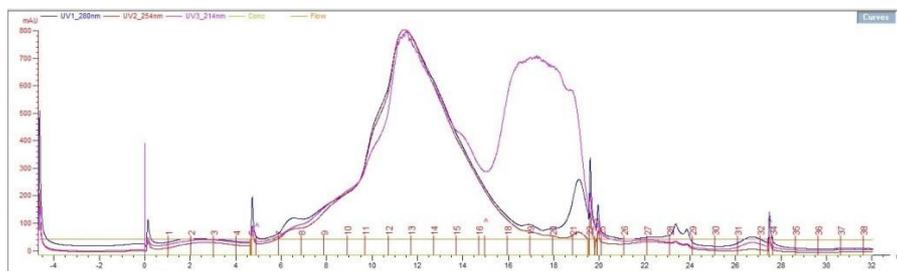


Figura 5. Cromatografia de coluna por gel filtração do extrato etéreo de *Ramalina aspera*. Curvas em azul UVI 280nm indicam proteínas; Curvas em vermelho UVI 254 nm indicam nucleotídeos; curvas roxo 214 nm indicam peptídeos.

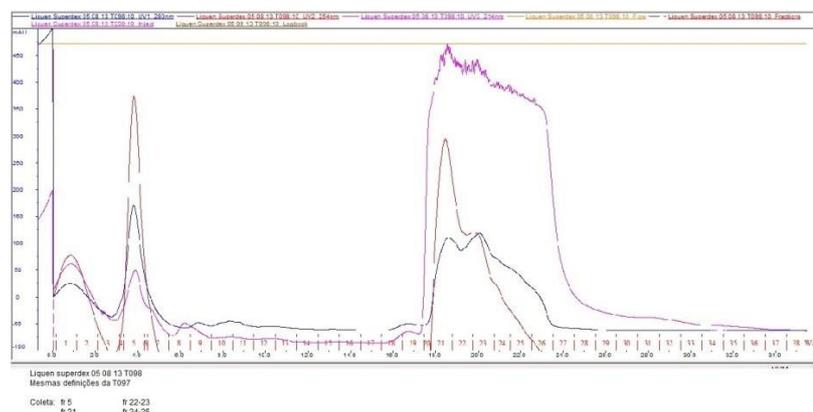


Figura 6. Cromatografia por gel filtração do ácido divaricático

Observa-se que as frações que apareceram no gráfico dos extratos, se mantiveram no gráfico do ácido divaricático purificado, porem mais livre de outras moléculas. Já nos tubos 19 a 22 do extrato etéreo observa-se, que as frações se sobressaem, mas ainda é encontrado outras moléculas. No gráfico do ácido divaricático puro, as frações apresentam-se mais separados.

Mesmo com a separação não houve purificação de proteína, talvez não seja proteína, pois com os solventes orgânicos utilizados pra extrair fenóis podem ter degradados a proteína. A fração que teve atividade, pode ser uma substancia/molécula que só apareça nas extrações para fenóis.

1.5. ANALISE EM SDS-PAGE EM GEL DEPOLIACRILAMIDA

A análise feita em SDS-PAGE de Gel de Poliacrilamida identificou o peso molecular da proteína encontrada no extrato etéreo. A figura 4 mostra que a proteína tem peso molecular de 72 KDa. Honda, 1998

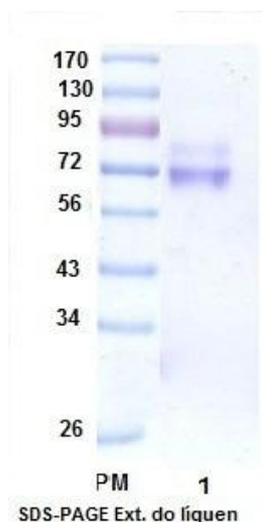


Figura 5. PM= Peso molecular da proteína encontrado no extrato etéreo através do teste de SDS-PAGE em Gel de Poliacrilamida.

2 CONCLUSÃO

Os testes de titulação viral mostraram que a ação antiviral, do extrato etéreo, possa estar numa concentração que é prejudicial à célula. O ácido divaricático teve efeito antiviral para o vírus da influenza H1N1. Não foi possível ver a ação antiviral contra o vírus do sarampo até o momento. A Cromatografia utilizando Coluna de Gel filtração fez a separação de peptídeos, nucleotídeos, e proteínas, respectivamente nos comprimentos de onda: 214 254 e 280 nm, porém não houve purificação de nenhuma dessas frações separadas. O peso molecular da possível proteína encontrada no extrato etéreo foi de 72 KDa. Não foi possível ver pesos molécula das frações separadas na cromatografia do ácido divaricático purificado. A fração que teve atividade pode ser uma substância que só apareça nas extrações para fenóis ou uma molécula muito pequena.