UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE SISTEMA NANOPARTICULADO CONTENDO ÁCIDO ÚSNICO

Marcela Silvestre Outtes Wanderley

Orientadora: Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães
Orientadora externa: Profa. Dra. Ana Olívia de Souza

Recife, fevereiro de 2007.

Marcela Silvestre Outtes Wanderley

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE SISTEMA NANOPARTÍCULADO CONTENDO ÁCIDO ÚSNICO

Dissertação apresentada para o cumprimento das exigências para obtenção do título de mestre em bioquímica pela Universidade Federal de Pernambuco.

Recife, fevereiro de 2007.

Wanderley, Marcela Silvestre Outtes

Avaliação da atividade antimicrobiana de sistema nanoparticulado contendo ácido úsnico / Marcela Silvestre Outtes Wanderley . – Recife: O Autor, 2007.

71 folhas : il., fig.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Bioquímica, 2007.

Inclui bibliografia e anexo.

1. Ácido úsnico. 2. Nanocápsulas. 3. Análise térmica 4. Atividade antimicobacteriana. 5. *Mycobacterium tuberculosis*. I. Título.

577.1 CDU (2.ed.) UFPE
572 CDD (22.ed.) CCB – 2007-066

COMISSÃO EXAMINADORA

_____

Presidente: Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães

_____

Titular interno: Profa. Dra. Maria Teresa dos Santos Correia

_____

Titular externo: Profa. Dra. Maria Lúcia Bianconi

_____

Titular externo: Profa. Dra. Noemia Pereira da Silva Santos

_____

Suplente interno: Profa. Dra. Maria da Paz Carvalho da Silva

_____

Suplente externo: Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade

Ata da defesa de dissertação da Mestranda **Marcela Silvestre Outtes Wanderley**, realizada em 22 de fevereiro de 2007, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Às 09:10 minutos do dia 22 de fevereiro de 2007, foi aberto, na Sala de Aulas do LIKA/UFPE, o ato de defesa de dissertação da mestranda **Marcela Silvestre Outtes Wanderley,** aluna do Curso de Mestrado em Bioquímica. Iniciando os trabalhos a Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães, orientadora da aluna, em virtude da impossibilidade da presença da Coordenadora do Curso, Profa. Vera Lúcia de Menezes Lima, fez a apresentação da aluna, de sua orientadora, ela própria, de sua Co-Orientadora Profa. Dra. Ana Olívia de Souza, do Instituto de Ciências Biomédicas/USP, e da Banca Examinadora composta pelos professores doutores: Nereide Stela Santos Magalhães, na qualidade de Presidente, Maria Tereza dos Santos Correia, ambos do Depto. de Bioquímica/UFPE, Noemia Pereira da Silva Santos, do Centro Acadêmico de Vitória/UFPE, e Maria Lúcia Bianconi, do Instituto de Bioquímica Médica/CCS/UFRJ. Após as apresentações, a Sra. Presidente convidou a aluna para a apresentação de sua dissertação intitulada: **"Avaliação da atividade antimicrobiana de sistema nanoparticulado contendo ácido úsnico",** e informou que de acordo com o Regimento Interno do Curso, o candidato disporia de até 50 (cinqüenta) minutos para apresentação do trabalho e o tempo de argüição para cada examinador, juntamente com o tempo gasto pelo aluno para responder às perguntas seria de 30 (trinta) minutos. A aluna procedeu a explanação e comentários acerca do tema em 35 (trinta e cinco) minutos. Em seguida, a Sra. Presidente convidou a Banca Examinadora para ocupar seus lugares e passou a palavra o primeiro examinador, a Profa. Dra. Maria Lúcia Bianconi, em seguida para a Profa. Dra. Noemia Pereira da Silva Santos, e finalmente para a Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia, os quais agradeceram o convite, fizeram alguns comentários, deram sugestões e iniciaram suas respectivas argüições. Ao final das mesmas, os referidos professores deram-se por satisfeitos. Em seguida, a Sra. Presidente usou da palavra para tecer alguns comentários, agradecer à Banca Examinadora e parabenizar a candidata. Finalmente, a sessão foi suspensa para proceder ao julgamento pela Banca Examinadora, a qual se reuniu na Secretaria do LIKA. Após alguns comentários, a Banca decidiu, por unanimidade, conceder a menção "**Aprovada com Distinção**". Nada mais havendo a tratar, lavrei a presente ata que vai assinada por mim, Secretário, e demais membros da Banca Examinadora. Recife, 22 de fevereiro de 2007.

"A maior recompensa para o trabalho do homem não é o que se ganha, mas o que ele nos torna".

(John Ruskin)

Dedico esta dissertação a toda minha família, em especial à minha mãe, Salete Silvestre, e a minha avó, Auxiliadora Silvestre.

ÍNDICE ANALÍTICO

Agradecimentos **7**

Lista de figuras **9**

Lista de tabelas **10**

Resumo **11**

Abstract **12**

I - Introdução **13**

1- Tuberculose **14**

1.1- Generalidades **14**

1.2- *Mycobacterium tuberculosis* **17**

1.3- Resistência micobacteriana **18**

2- Ácido úsnico **19**

2.1- Propriedades físico-quimicas do ácido úsnico **19**

2.2 - Propriedades biológicas do ácido úsnico **20**

2.3- Toxicologia do ácido úsnico **23**

3- Nanotecnologia farmacêutica **25**

3.1- Generalidades **25**

3.2- Sistemas terapêuticos de liberação controlada **26**

3.3- Nanocápsulas **31**

3.4 - Associação do ácido úsnico em carreadores poliméricos **31**

II - Objetivos **33**

III– Artigo científico:

Physicochemical characterization and antimycobacterial activity of usnic acid-loaded nanocapsules **35**

IV – Conclusões **54**

V – Referências **56**

VI – Anexo I: Normas para publicação na revista Phytomedice **66**

VII – Anexo II: Resumos apresentados em congressos **69**

AGRADECIMENTOS

À Deus por permitir a realização de muitos dos meus sonhos, sendo este trabalho um deles, e por seu imenso amor demonstrado em todos os momentos de minha vida;

À minha orientadora Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães, pelo carinho, prestimosa orientação científica e moral, pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa e pela confiança transmitida. Muito obrigada por todos os seus ensinamentos científicos, dispensados a minha pessoa;

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo utilizada como fonte financeira para a realização deste trabalho;

À minha mãe, Salete Silvestre, um exemplo de profissional, mulher e mãe. Sou grata por todo o amor, força, estímulo e carinho;

À minha avó, Auxiliadora Silvestre primeiramente pelo seu exemplo de vida, mas também pelo carinho e confiança em mim depositada;

Ao meu pai, Antonio Wanderley, por acreditar que com perseverança alcançamos nossos objetivos;

Aos meus irmãos, Flávia Silvestre e Artur Silvestre, pelo carinho, amizade e incentivo importantes para concretização deste trabalho;

Às minhas tias, Fátima Silvestre, Bernadete Silvestre, Mª do Pérpetuo Socorro (*in memorian*); minha prima Poliana Silvestre; meus avós, José Silvestre (*in memorian*), Mª Aparecida Wanderley e José de Gusmão Outtes; meu tio Pedro Fioravante; e a Alice Wanderley; pela força, pelo carinho e confiança dispensados ao longo de toda a minha vida;

À Fernando Júnior pelo amor, confiança, amizade, carinho e força, os quais foram de extrema importância para conclusão de mais uma etapa;

À um Ser vivo muito especial que muito me ensinou, minha pequenina Lady (*in memorian*).

À Coordenadora do Mestrado em Bioquímica desta Universidade: Profa Dra. Vera Menezes pelo apoio conferido durante o desenvolvimento deste projeto;

Ao Diretor do Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA) Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho, por ceder as condições de infra-estrutura necessárias para a realização deste trabalho;

Ao secretário do Mestrado em bioquímca da UFPE: Djalma Santos, pela paciência e carinho;

Ao secretário do departamento de bioquímica da UFPE: Miron, pelo carinho, paciência e amizade;

Aos Professores do mestrado em Bioquímica por todos os ensinamentos importantes para o desenvolvimento deste trabalho;

Aos professores do Instituto de Bioquímica Médica da UFRJ: Débora Foguel, Russolina Zingali e Maria Lúcia Bianconi, pelo acolhimento, amizade e contribuição científica;

À Profa. Dra. Noemia Pereira dos Santos, por sua paciência e boa vontade no esclarecimento de minhas dúvidas;

Aos Prof. Dr. Nicácio Henrique da Silva e à Profa. Dra. Eugenia Cristina Pereira por contribuir com deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Célio Lopes Silva e à Profa. Dra. Ana Olívia Souza, pela colaboração com o nosso grupo de pesquisa;

Aos integrantes e acima de tudo grandes AMIGOS do grupo de sistema de liberação controlada de medicamentos: Milena Sales (Mi), Mariane Lira (Mari), Dáfila Gabriela (Darlinha), Fábio Fidelis, Islene Barbosa (Pequena), Ana Carolina Cintra, Taciana Salviano (Taci), Débora Máximo, André Meoli, Luciana Afonso, Elizângela, e Paula Hirakawa pela convivência e auxílios fornecidos em vários momentos da pesquisa;

Aos meus grandes amigos frutos da convivência científica: Cinthia Meireles, Cícero Moraes e Maregilson Pontes pela amizade e troca de experiência cientifica;

Às minhas amigas e irmãs: Patrícia Pires, Pollyana Cavalcanti e Lylyanne Andrade por sempre estarem presentes oferecendo ajuda nos momentos mais difíceis;

Aos meus colegas: Fernanda Vidal, Fabricio Andrade, Humberto Bertão, Paula Hirakawa, Cyntia Wessen, Alba Serafim, Juliene Coelho, Elaine Virgínia, Chirleyanne, Lucíola pela companhia e palavras de otimismo;

À minha grande amiga Raquel Siebra pelo companheirismo, carinho, dedicação, força e amizade;

A todos do Laboratório de Bioquímica do LIKA: Ian Porto, Diego, Talita Espósito, Ricardo, Fábio Malessa, Adriana Andrade, Jaqueline Maciel, e Givanildo pela amizade;

Aos amigos do biotério do LIKA Felipe e Maria Helena pela amizade;

Aos órgãos financiadores, pelo apoio na realização desta pesquisa;

A todos os outros colegas e amigos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização desse trabalho.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Ilustração da infecção pulmonar pelo *M. tuberculosis.* **16**

Figura 2. Micrografia do *Mycobacterium tuberculosis.* **17**

Figura 3. Estrutura química do ácido úsnico. **19**

Figura 4. Micrografia da *Cladonia substellata.* **20**

Figura 5. Via da biossíntese do ácido úsnico. **21**

Figura 6. Ilustração do tamanho de pequenas estruturas. **25**

Figura 7. Esquema da degradação e absorção do PLGA *in vivo.* **29**

ARTIGO CIENTÍFICO

Figura 1. Chemical structure of usnic acid. **39**

Figura 2. Atomic force microscopic images of usnic acid-loaded PLGA nanocapsules. **43**

Figura 3. Infrared spectra of usnic acid-loaded nanocapsules, empty nanocapsules and usnic acid. **45**

Figura 4. Differential scanning calorimetric curves of free usnic acid, empty nanocapsules and usnic acid-loaded nanocapsules. **46**

Figura 5. Differential thermogravimetric curves of free usnic acid, empty nanocapsules and usnic acid-loaded nanocapsules. **47**

Figura 6. Intracellular antimycobacterial activity of usnic acid and usnic acid-loaded nanocapsules on macrophages J774 infected with *M. tuberculosis* H37Rv. **49**

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1. Locus genéticos envolvidos na resistência do *M. tuberculosis.* **18**

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) do (+) e (-)-ácido úsnico. **22**

Tabela 3. Sistemas de liberação controlada de medicamentos. **27**

RESUMO

O presente trabalho avalia a caracterização físico-química e a atividade antimicobacteriana *in vitro* do ácido úsnico (AU) encapsulado em nanocápsulas (NC-AU) de copolímero de ácido D,L-(láctico-glicólico) (PLGA) (50:50). O espectro de infravermelho da NC-AU mostrou uma banda de absorção em 1750 cm^{-1} atribuído aos grupos ésteres do PLGA. As bandas de absorção nas faixas de 1635 e 1190 cm^{-1} foram referentes ao grupo aromático da cetona e ao grupo fenil do ácido úsnico, respectivamente. A análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC) da NC-AU revelou a presença de um pico endotérmico em 45,5 °C com variação da entalpia de 23,8 J/g. Enquanto que o AU apresentou um único pico endotérmico em 201,7 ºC referente ao seu ponto de fusão, com variação da entalpia de 85,2 J/g. A encapsulação do ácido úsnico ocorreu sem interação molecular com o polímero. A análise termogravimétrica da NC-AU e da nanocápsula vazia (NC) mostrou duas fases de degradação, enquanto que o AU apresentou uma única fase de decomposição. Nenhuma perda de peso da NC-AU e da NC foi observada até 50 °C, sugerindo que as amostras foram estáveis até essa temperatura. A susceptibilidade do *M. tuberculosis* ao AU e NC-AU foi de 7,98 e 3,83 μg/mL, respectivamente. A análise da atividade intracelular revelou um aumento de 30% na atividade antimicobacteriana do AU quando encapsulado nas nanocápsulas de PLGA. Dessa maneira, conclui-se que a encapsulação em nanocápsulas de PLGA potencializa a atividade antimicobacteriana *in vitro* do AU.

Unitermos: Ácido úsnico, nanocápsulas, análise térmica, atividade antimicobacteriana, *Mycobacterium tuberculosis*.

ABSTRACT

This study reports the physicochemical characterization of the usnic acid-loaded nanocapsules of D,L-(lactide-glycolide) copolymer (PLGA) and their *in vitro* antimycobacteial activity. The usnic acid-loaded nanocapsules (UA-NC) infrared spectrum showed an absorption band at 1750 cm^{-1} assigned to PLGA ester groups. The bands at 1635 and 1190 cm^{-1} are due to aromatic ketone group and phenyl group of the usnic acid (UA), respectively. Differential scanning calorimetry analysis of UA-NC revealed a transition phase at 45.5 °C with an enthalpy change of 23.8 J/g, while UA presented a single endothermic transition of fusion at 201.7 °C with an enthalpy change of 85.2 J/g. UA encapsulation occurred thus without an interaction at molecular level with the polymer. Thermogravimetric analysis of usnic acid-loaded nanocapsules and empty nanocapsules (NC) showed two-step degradation, whereas the UA presented a single decomposition phase. No loss of weight in UA-NC or NC was observed up to 50 °C suggesting that both samples were stable at this temperature. The susceptibilities of the *M. tuberculosis* to free and nanoencapsulated UA were 7.98 and 3.83 μg/mL, respectively. The analysis of intracellular activity revealed that an increase of 30 % in the antimycobacterial activity of UA was achieved for the nanoencapsulated dosage form. In this way, the encapsulation of UA into nanocapsules improved its *in vitro* antimycobacterial effectiveness.

Keywords: Usnic acid, nanocapsules, thermal analysis, antimycobacterial activity, *Mycobacterium tuberculosis*.

I – INTRODUÇÃO

1. TUBERCULOSE

1.1-Generalidades

A Tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa grave que acompanha o homem desde os tempos pré-históricos (ARCUS et al, 2006). No entanto, no século XIX, o cientista médico alemão Heinrich Hermann Robert Koch isolou o bacilo causador dessa moléstia, o *Mycobacterium tuberculosis*, e em sua homenagem o bacilo da TB ficou conhecido com o bacilo de Koch (BK). Apenas no século XX, conseguiram-se grandes avanços no tratamento da TB (SOUZA et al, 2005). Nos últimos anos, essa doença está ressurgindo como um sério problema de saúde pública. Aproximadamente 1/3 da população mundial (cerca de dois bilhões de pessoas) está infectada pelo *M. tuberculosis.* **S**endo que, em países pobres, a estimativa é de 70% da população esteja infectada pelo bacilo de Koch, com cerca de 2,8 milhões de mortes por tuberculose e 7,5 milhões de novos casos. Já nos países ricos, esse número é menor que 10%, com uma estatística anual de mais de 400.000 novos casos e cerca de 40.000 mortes (WHO, 2006).

Depois de 40 anos de declínio, a tuberculose começa a atacar os países industrializados de forma descontrolada. Na Europa, os países do leste apresentam situação mais alarmante, com cerca de 250 mil casos por ano. Mas é em certas zonas da África e da Ásia que a doença é predominante (WHO, 2006). O Brasil ocupa o 13º lugar entre os 22 países que concentram 80% dos casos de TB do mundo (WHO, 2006). De acordo com os dados oficiais do Ministério da Saúde, existem atualmente cerca de 50 milhões de pessoas infectadas com o *M. tuberculosis*, mas que não desenvolveram a doença. Anualmente surgem, aproximadamente, 111 mil novos casos e seis mil mortes. Em 2005, TB foi a 9ª causa de internação, 7º lugar em gastos com internação (Sistema único de saúde) e a 4ª causa de mortalidade por doença infecciosa no Brasil (http://www.datasus.gov.br).

A TB ocorre com maior frequência em áreas de grande concentração populacional e com precárias condições socioeconômicas e sanitárias. Atinge todos os grupos etários, com maior predomínio nos indivíduos economicamentes ativos (15-54 anos). O número de casos de homens infectados é o dobro em relação aos casos de mulheres infectadas, uma vez que o alcoolismo acomete mais os homens em relação à mulheres (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004). Estima-se que, entre 2002 e 2020, aproximadamente 1 bilhão de pessoas sejam infectadas, cerca de 150 milhões de pessoas irão desenvolver a doença e 36 milhões irão morrer de tuberculose se não forem tomadas medidas eficazes (GLOBAL ALLIANCE FOR

TB DRUG DISCOVERY, 2003). As estatísticas nacionais e internacionais não deixam dúvida e servem de alerta para o problema.

A epidemia da tuberculose está aumentando em todo o mundo e se tornando cada vez mais perigosa. O colapso dos serviços de saúde, a expansão da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA) e a crescente resistência aos medicamentos estão a contribuir para agravar o impacto dessa doença (WHO, 2006). Aproximadamente, 95% da mortalidade por tuberculose, no mundo, estão relacionados com a co-infecção com o HIV devido à supressão do sistema imune. Outros fatores relacionados com essa moléstia são condições socioeconômicas, alcoolismo, a migração de regiões endêmicas e a multirresitência do bacilo a terapia utilizada (GROUPE DE TRAVAIL DU CONSEIL SUPÉRIEUR D'HYGIÈNE PUBLIQUE DE FRANCE, 2004; PHILLIPS et al, 2007).

A TB é transmitida basicamente pelo ar e pode atingir todos os órgãos do corpo, porém como o BK se reproduz e se desenvolve rapidamente em áreas do corpo com muito oxigênio, o pulmão é o principal órgão atingido pela doença (figura 1). O alojamento do bacilo nesse órgão ocorre por tempo indefinido. O espirro ou tosse de uma pessoa infectada joga no ar cerca de dois milhões de bacilos que permanecem em suspensão durante horas (SOUZA et al, 2005; RODRIGUES et al, 2004). Um indivíduo sadio inala gotículas, dispersas no ar, de secreção respiratória do indivíduo doente. Após inalação, os bacilos atingem os alvéolos (primoinfecção) onde provocam uma reação inflamatória e exsudativa do tipo inespecífica, podendo se espalhar para os nódulos linfáticos. Em 95 % dos indivíduos infectados, o sistema imunológico consegue impedir o desenvolvimento da doença. Porém, em 5 % dos indivíduos, observa-se a implantação dos bacilos no parênquima pulmonar, em decorrência da diminuição da resistência orgânica (desnutrição, subnutrição, estresse ou associação a outras doenças). A partir dessa fase de reprodução, considera-se instalada a doença, podendo ocorrer a contaminação de outras pessoas (RODRIGUES et al, 2004).

Os sintomas mais freqüentes da tuberculose são: comprometimento do estado geral, tosse (inicialmente seca e posteriormente produtiva, acompanhada ou não de escarros hemoptoícos), febre, suor noturno, dor no tórax, anorexia (perda de apetite) e adinamia (falta de disposição) (SOUZA et al, 2005). Se não tratada, a TB pode levar a complicações como distúrbios ventilatórios, infecções respiratórias de repetição, formação de bronquiectasias, hemoptise, atelectasia e empiemas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004). Na rotina ambulatorial, os exames utilizados para o diagnóstico da TB são a baciloscopia de escarro, a radiologia do tórax (presença de nódulos infiltrados nos pulmões), o teste tuberculínico (PPD)

(que evidencia o contato prévio com o bacilo) e a cultura do escarro. Novas técnicas para isolamento, identificação e provas de sensibilidade de micobactérias estão sendo implantadas em vários laboratórios. Em curto prazo, continuarão sendo utilizados métodos convencionais; entretanto as técnicas moleculares estão sendo introduzidas para identificação rápida do *M. tuberculosis*. Dentre essas, estão a reação em cadeia da polimerase (PCR) e o BACTER (Becton Dickinson Diagnostic Instrument System) (KONEMAN, 2001).

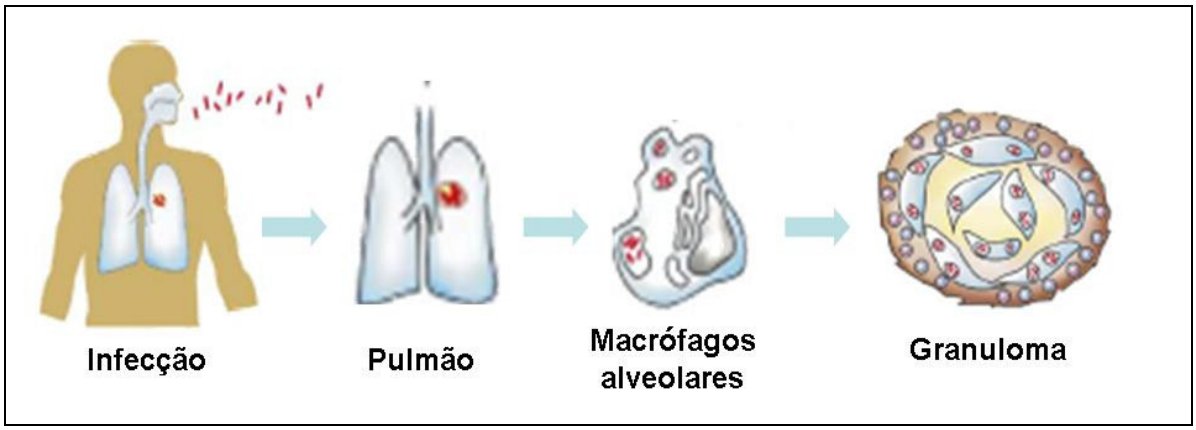


Figura 1. Ilustração da infecção pulmonar pelo *M. tuberculosis*, que se inicia pela inalação de gotículas de secreção respiratória, dispersas no ar, do indivíduo infectado. Então, os bacilos atingem os alvéolos pulmonares, infectando macrófagos e provocando uma reação inflamatória e exsudativa do tipo inespecífica. No parênquima pulmonar, o *M. tuberculosis* libera lipídeos de sua parede celular nas células hospedeiras, que, juntamente com o recrutamento de linfócitos, induz a formação do granuloma (SILVA et al, 2001; RODRIGUES et al, 2004; EDDINE et al, 2006**).**

Na atualidade, há três drogas de primeira escolha para o tratamento da tuberculose, são elas a isoniazida, rifampicina e pirazinamida. Dentre os fármacos de segunda escolha, encontram-se o etambutol e a esteptomicina (ARCUS et al, 2005). O esquema terapêutico adotado para o tratamento da TB consiste na associação desses fármacos e se estende até seis ou oito meses (PAULI et al, 2005). São utilizadas altas doses, levando a vários efeitos colaterais como náuseas, vômitos, icterícia, perda de equilíbrio, asma, alterações visuais, diminuição da audição, neuropatia periférica e até cegueira (SOUZA et al, 2005). O diagnóstico e o tratamento precoce da TB evitam a disseminação da doença, além de, em duas ou três semanas após inicio do tratamento, pode cessar o contágio da moléstia (DOMBRET, 2004).

1.2-*Mycobacterium tuberculosis*

O *Mycobacterium tuberculosis* (figura 2) é uma bactéria aeróbica obrigatória, da família Mycobacteriacea e tem seu crescimento lento. Se divide a cada 16 ou 20 horas, tempo relativamente longo comparado a outras bactérias que normalmente têm suas divisões contadas em minutos (por exemplo a *E. coli* pode-se dividir a cada 20 minutos aproximadamente). É um bacilo ácido-álcool resistente (BAAR) que pode resistir a desinfectantes fracos e sobreviver em meio seco no estado latente por semanas. O *M. tuberculosis* é um patógeno intracelular, podendo crescer e sobreviver em macrófagos hospedeiros e persistir dentro de granulomas durante décadas antes de sua reativação, permitindo crescimento e disseminação (HAYDEL & CLARK-CURTISS, 2004; GIRARD et al, 2005).

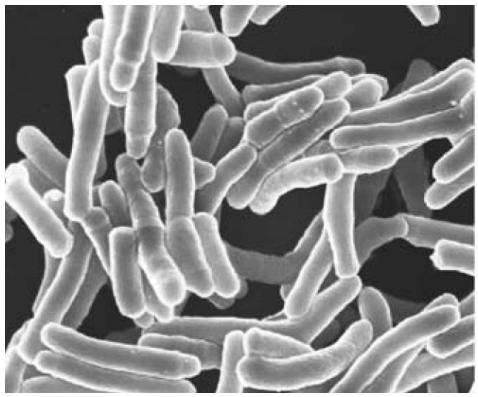


Figura 2. Microfotografia do *Mycobacterium tuberculosis* (BOSHOFF & BARRY, 2006).

Dentre os constituintes do envelope celular do *M. tuberculosis*, encontram-se os peptideoglicanos e uma bicamada assimétrica contendo longas cadeias de ácido micólico, que limitam a passagem de moléculas hidrofóbicas e hidrofílicas, respectivamente. Dessa maneira, o transporte de substâncias do meio externo para dentro do citoplasma do *M. tuberculosis* é realizado por canais protéicos do tipo porina (NGUYEN & THOMPOSON, 2006). Essa parede celular resistente é responsável pela proteção do bacilo, além de promover sua persistência intracelular (DERETIC et al, 1999).

A fase de latência é também um aspecto importante da patogênese da TB. O *M. tuberculosis* libera lipídeos de sua parede celular nas células hospedeiras, que juntamente com o recrutamento de linfócitos, induz a formação do granuloma (figura 1). Esse granuloma servirá como uma barreira de proteção para o *M. tuberculosis* contra a resposta imune e,

provavelmente, é o responsável pela latência e pela persistência da infecção (GIRARD et al, 2005; SILVA et al, 2001).

1.3-Resistência micobacteriana

A resistência do *M. tuberculosis* ocorre devido à sua habilidade de permanecer nas células hospedeiras, onde o fármaco bactericida necessita ser administrado de maneira prolongada para combater essa bactéria (GÓMEZ & MCKINNEY, 2004). O longo período de tratamento favorece o abandono do esquema terapêutico, possibilitando a seleção de cepas de altas resistências (ARCUS et al, 2006). Outro fator predisponente à ocorrência de resistência micobacteriana é o uso irregular das drogas (GOMES et al, 2000).

Relatos científicos demonstram que essa resistência pode estar relacionada com a impermeabilidade da parede celular do *M. tuberculosis*, que funciona como uma barreira para a penetração do antibiótico. Porém, esse mecanismo isolado não favorece o desenvolvimento da resistência do *M. tuberculosis* a antibióticos. (NGUYEN & THOMPOSON et al, 2006). Outro fator relacionado com a resistência é a mutação genética no *M. tuberculosis*. As mutações não permitem o direcionamento do fármaco ao sítio-alvo ou então, que haja alteração no metabolismo da droga. Por exemplo, a pirazinamida necessita ser hidrolisada pela enzima bacteriana pirazinamidase para que seu metabólito ativo, o ácido pirazinóico, possa agir. O principal mecanismo molecular de resistência a essa droga envolve mutações no gene pncA, que codifica a pirazinamidase, e, assim, impossibilita a formação do metabólito ativo conta o *M. tuberculosis* (RATTAN, et al, 1998). A tabela 1 relaciona alguns genes envolvidos no desenvolvimento da resistência micobacteriana às drogas anti-TB.

Tabela 1. Locus gênicos envolvidos na resistência do *M. tuberculosis* (RATTAN et al, 1998).

Droga	Gene
Rifampicina	*rpo*B
Isoniazida	*kat*G
Estreptomicina	*rps*L
Pirazinamida	*pnc*A
Etambutol	*emb*CAB

A literatura biomédica relata a urgente necessidade de desenvolver novas drogas para o combate da TB. Dessa maneira, produtos naturais vêm recebendo considerável atenção como agentes anti-TB contra tuberculose (SOUZA et al, 2005).

2- ÁCIDO ÚSNICO

2.1 Propriedades físico-químicas do ácido úsnico

O ácido úsnico, [2,6-diacetil-7,9-dihidroxi-8-9b-dimetil-1,3(2H,9β/αH)-dibenzofurandiona; $C_{18}H_{16}O_7$] (figura 3), é uma substância obtida de diferentes espécies de liquens (figura 4). Os liquens são resultantes da simbiose de fungos (micobionte) e algas e/ou cianobactérias (ficobiontes), cujo fungo é o exohabitante (NASH, 1996). O ácido úsnico caracteriza-se por ser uma substância de pigmentação amarelada e de baixa solubilidade em água. Ocorre na natureza em duas formas enatioméricas (-) e (+), indicando uma projeção angular do grupamento metil localizado na posição 9b; que podem apresentar atividades biológicas e mecanismos de ação distintos (INGÓLFSDÓTTIR, 2002). Essa substância apresenta caráter hidrofóbico, sendo insolúvel em água e glicerol, parcialmente solúvel em etanol e facilmente diluído em éter quente, acetona, benzeno e clorofórmio (ASAHINA & SHIBATA, 1954; TAKAI et al, 1979). Em água, a solubilidade é menor que 10 mg/100 mL a 25°C (INGÓLFSDÓTTIR, 2002). Essa característica hidrofóbica do ácido úsnico é explicada pela presença dos três grupos cetônicos e ao anel furano unindo seus anéis aromáticos (ASAHINA & SHIBATA, 1954), além de pontes de hidrogênio intramolecular, que contribuem para sua natureza lipofílica (MÜLLER, 2001). Sua acidez é justificada pela presença do anel fenólico, cuja estrutura é instável (SHIBATA, 2000). O ponto de fusão do ácido úsnico é em torno de 203°C e o peso molecular de 344.32 g (INDEX MERCK, 1995).

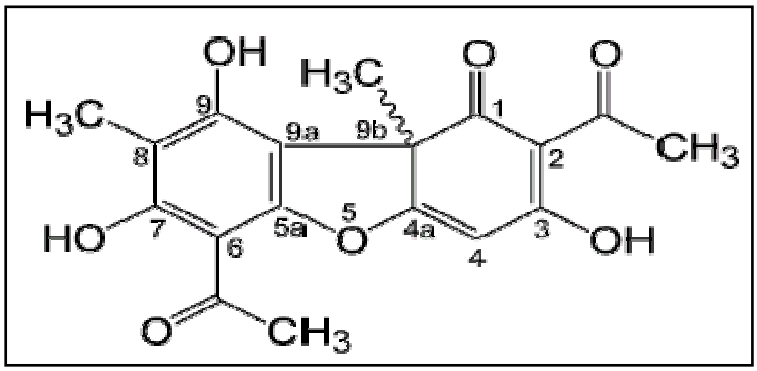


Figura 3. Estrutura química do ácido úsnico.

A biossíntese do ácido úsnico procede pela via do acetato polimalonato (figura 5). Inicialmente, são formadas unidades fenólicas monocíclicas, originadas a partir de ácidos carboxílicos, derivados do ácido acético. Essas unidades fenólicas são sintetizadas a partir da acetil-CoA e malonil-CoA, através de sintetases aromáticas, que não possuem subunidades desidrogenadas. Os passos subseqüentes de sua biossíntese envolvem o acoplamento estéreo-específico de duas unidades metilfloroacetofenona originando, portanto, o ácido úsnico hidratado. Finalmente, ocorre a desidratação da molécula levando à formação da ligação éter (INGÓLFSDÓTTIR, 2002).

Figura 4. Micrografia do liquen *Cladonia substellata*.

2.2 - Propriedades biológicas do ácido úsnico

Antimicrobiana

A descoberta do ácido úsnico ocorreu mediante a busca por novos compostos antibióticos (BUSTINZA, 1951). Desde então, vários estudos comprovaram sua atividade antimicrobiana. Grasso (1989) avaliou a atividade *in vivo* do ácido úsnico contra o *Streptococcus mutans*, agente etiológico da cárie dental e de doenças periodontais. Em adição, trabalhos realizados por Lauterwein e colaboradores (1995) indicam que os ácidos úsnico e vulpínico são ativos contra algumas espécies de bactérias Gram-positivas e fungos, porém não apresentam efeitos contra as Gram-negativas. Esses resultados estão de acordo com Hale (1983), que relata a ineficiência dos ácidos úsnico e protoliquesterínico contra bactérias Gram-negativas dos gêneros *Escherichia*, *Salmonella* e *Shighella*.

A atividade antimicrobiana do ácido úsnico está associada com o desacoplamento da fosforilação oxidativa em células microbianas (ABO-KHATWA, 1996). Além de modificar a permeabilidade da membrana, produção do ATP, a produção e atividade enzimática das bactérias, é um potente inibidor de microrganismos Gram-positivos, aeróbicos e anaeróbicos

(MARCANO et al, 1999). A tabela 2 ilustra a atividade antimicrobiana do ácido úsnico contra diferentes microrganismos.

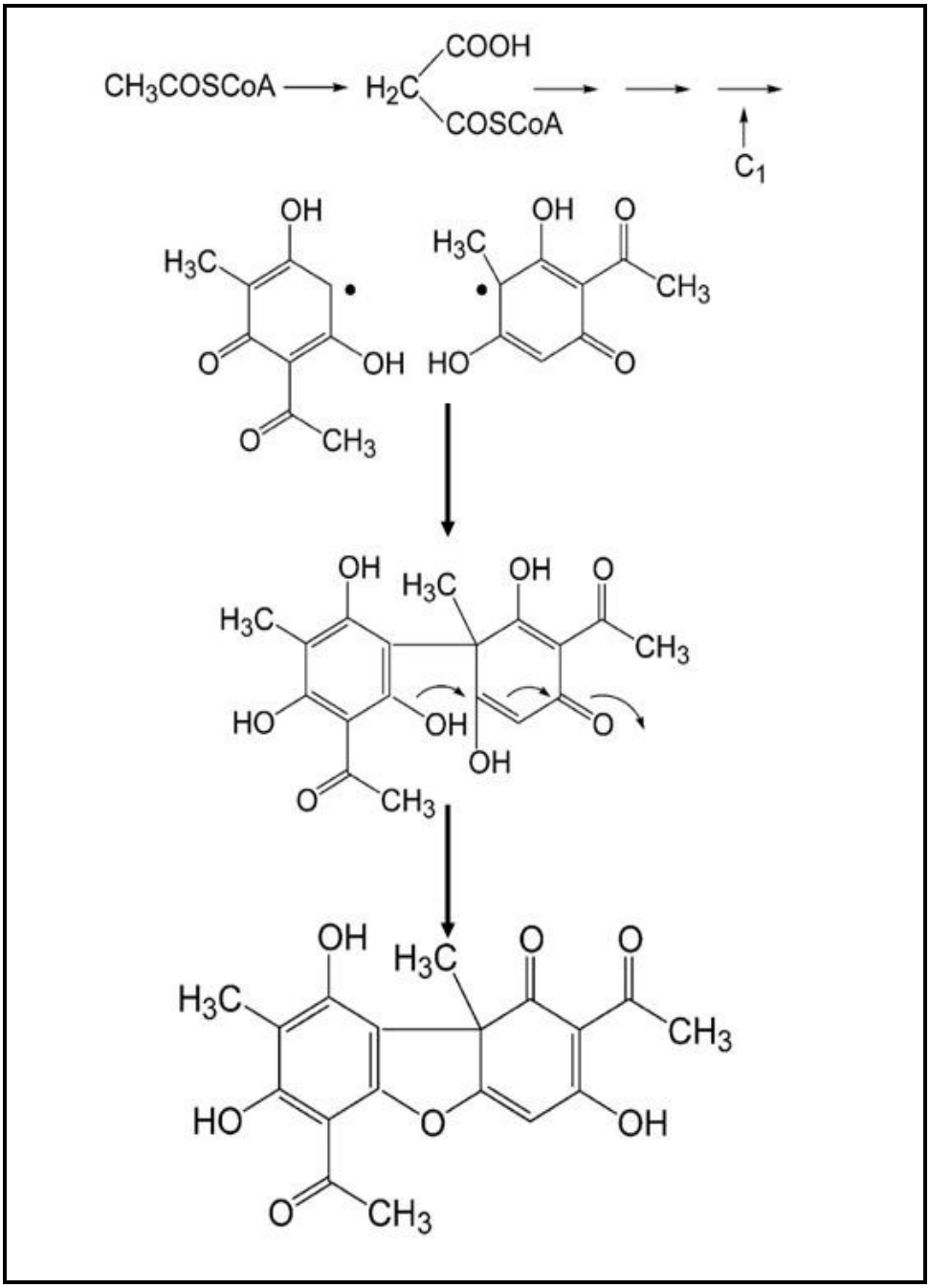


Figura 5. Via da biossíntese do ácido úsnico (INGÓLFSDÓTTIR, 2002).

Antitumoral

A atividade antitumoral do ácido úsnico foi revelada há mais de duas décadas. Em 1975, Kupchan e Kopperman publicaram o primeiro estudo contra o carcinoma pulmonar de Lewis (TAKAI et al, 1979; MÜLLER, 2001). A partir daí, em estudos *in vitro*, o ácido úsnico demonstrou sua ação antitumoral frente a diferentes linhagens celulares, tais como

queratinócitos humanos HaCaT (KUMAR & MÜLLER, 1999), células de câncer de mama (MCF7 e MDAMB231) e de câncer de pulmão (H1299 e NCIH 292) (MAYER et al, 2005; SANTOS et al, 2005). Quando incorporado à β-ciclodextrina, demonstrou sua atividade antiproliferativa contra células malignas da linhagem K-562 (leucemia), T-47-D (câncer de mama), Panc1 (câncer de pâncreas) e PC-3 (câncer de próstata) (KRISTMUNDSDÓTTIR et al, 2005).

Na avaliação dessa atividade biológica *in vivo*, o ácido úsnico inibiu em 40% o crescimento tumoral, em Camundongos contaminados com tumor Sarcoma-180, após tratamento com 15 mg/kg de ácido úsnico (SANTOS et al, 2006).

Antiviral, Antiparasitária e Antifúngica

O ácido úsnico tem expressado atividade antiviral (CAMPANELLA et al, 2002), no tratamento adjuvante da infecção por HPV, quando associado com o sulfato de zinco, demonstrando duplo efeito terapêutico: na reepitelização do tecido lesado e como agente antiviral. Dessa maneira, possibilitou a terapia adjuvante no tratamento cirúrgico desobstrutivo e, em particular, da lesão causada pelo HPV (SCIRPA et al, 1999). O ácido úsnico inibiu a proliferação do Poliomavírus de ratos, pela destruição do DNA viral, através da inibição da transcrição do RNA (CAMPANELLA et al, 2002), além de demonstrar inibição do Eptein-Barr vírus, sendo a forma dextrogira a que apresentou maior atividade em relação à levogira (YAMAMOTO et al, 1995).

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) do (+) e (-) ácido úsnico.

Microrganismo	**CIM do ácido úsnico (μg/mL)**		**Referência**
	(+)-Ácido úsnico	**(-)-Ácido úsnico**	
E. faecalis	4	8	LAUTERWEIN, 1995
E. faecium	16	16	LAUTERWIN, 1995
S. aureus	6	8	CORRECHE,1998
	8	8	LAUTERWEIN, 1995
	32	ND (*)	FRANCOLINI, 2004
C. perfringens	4	4	LAUTERWEIN, 1995
B.vulgatus	4	8	LAUTERWEIN, 1995
M.aurum	32	ND (*)	INGÓLFSDÓTTIR, 1998

(*)ND= Não determinado

A atividade antiparasitária de metabólitos secundários, isolados de liquens Chilenos, foi avaliada, *in vitro*, frente à forma promastigota de três cepas de *Leishmania sp*: *L. braziliensis, L. amazonensis e L. donovani*; pode-se observar que o (+)-ácido úsnico é um interessante componente antiparasitário. Uma vez que, na concentração de 25 µl/mL, promoveu lise total das três cepas. Nesse mesmo trabalho o estudo *in vivo* revelou que o ácido úsnico exibiu interessante atividade antiparasitária em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*, mostrando significante diminuição da lesão cutânea (FOURNET et al, 1997). O ácido úsnico mostrou-se ativo contra o *Trichomonas vaginalis* em estudos *in vitro* (WU et al, 1995) e, contra o *T. Cruzi* inibiu significativamente o crescimento e viabilidade da forma epimastigota, além da destruição total da forma tripomastigota (DE CARVALHO et al, 2005).

A atividade antifúngica do ácido úsnico também foi descoberta nos anos 50, quando se observou a inibição do fungo *Tricophyton mentagrophytes* após tratamento com o referido ácido (BUSTINZA, 1951). Em 1996, Proska e colaboradores observaram inibição no crescimento do *Penicillum fraquentans* e *Verticillium albo-atrum*, após tratamento com ácido úsnico.

Gastroprotetor

Recentes estudos indicam que o ácido úsnico, isolado da *Usnea longissima*, está sendo testado no tratamento da úlcera gástrica em animais. Induzida pela indometacina, lesões gástricas foram significativamente reduzidas por todas as doses utilizadas de ácido úsnico, quando comparado com o grupo tratado com a ranitidina, droga referência. Esse efeito gastroprotetor do ácido úsnico pode ser atribuído ao seu efeito redutor contra o dano oxidativo e seu efeito inibitório na infiltração neutrofílica em estômago de ratos (ODABASOGLU et al, 2006).

2.3-Toxicologia do ácido úsnico

O mecanismo de ação do ácido úsnico não está completamente elucidado. Porém, há várias propostas relatadas na literatura que buscam desvendá-lo. Fortes indícios relacionam o mecanismo de ação do ácido úsnico com a respiração celular. Johnson e colaboradores (1950) descreveram o relevante efeito do ácido úsnico na respiração, em homogenatos de rim de rato, bem como o desacoplamento da fosfoliração oxidativa, em homogenato de fígado de rato, com concentrações mínimas de 1,3-2,6 µg/ml. Vavasseur e colaboradores (1991) também

evidenciaram o potencial inibitório do ácido úsnico sobre processos respiratórios aeróbicos em células vegetais de *Cormmelina communis*. Abo-Khatwa e colaboradores (1996) relataram que os ácidos úsnico e vulpínico e a atranorina apresentaram ação como desacopladores da fosforilação oxidativa quando testados em mitocôndria de fígado de ratos. Esses compostos atuaram no interior da membrana mitocondrial através de suas propriedades lipofílicas com características semelhantes ao do 2,4-dinitrofenol.

Pramyothin e colaboradores (2004) constataram que o (+) ácido úsnico age alterando a integridade da membrana celular, permitindo a liberação de enzimas hepatoespecíficas, principalmente das transaminases, além de causar destruição da função mitocondrial. Dessa maneira, confirma sua ação de desacoplador da fosforilação oxidativa sugerida anteriormente. Esse dano hepatocelular foi confirmado quando indivíduos, nos Estados Unidos, que consumiram LipoKinetix®, um suplemento dietético que contém ácido úsnico como componente, apresentaram falência aguda do fígado (NEFF et al, 2004). Estudos posteriores enfatizaram a elevada hepatoxicidade do ácido úsnico, quando se observou 98 e 100% de necrose após tratamento de cultura de hepatócitos murinos com 5μM e 10μM, respectivamente, de ácido úsnico. Também foi visualizada redução de até 90% nos níveis de ATP. Além de, em cultura de hepatócitos, constatar-se inibição da respiração mitocondrial. Esses achados comprovam a inibição direta da função mitocondrial, levando ao aumento da produção de oxigênio reativo pela cadeia transportadora de elétrons, levando à morte celular (HAN et al, 2004).

Além de desacoplador da fosforilação oxidativa, outros mecanismos de ação do ácido úsnico foram propostos. A redução nos níveis de RNA em testes com ratos tratados com 100–200 mg/Kg de ácido úsnico sugere ação direta do ácido úsnico na síntese de RNA (AL-BEKAIRI et al, 1991). O ácido úsnico apresenta ação análoga em sistemas biológicos filogeneticamente distantes. Os resultados obtidos por Cardarelli e colaboradores (1997) sobre a ação desse ácido em inúmeros sistemas biológicos sugerem que ele atua similarmente em células animais e vegetais, provavelmente interferindo em um passo importante de sua divisão, comum a diferentes células. Avaliando a expressão da proteína p53, constatou-se que o estresse oxidativo e o rompimento do processo metabólico normal de células cancerígenas MCF7, tratadas com o ácido úsnico, não estão envolvidos com danos ao DNA (MAYER et al, 2005).

3-NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA

3.1-Generalidades

Nanotecnologia é a aplicação da ciência em sistemas na escala nanométrica, ou seja, estruturas com tamanho característico de 0,1 a 1000 nanômetros (nm) (figura 6). Na área biomédica, a nanotecnologia está sendo empregada em diferentes campos como da nanobiotecnologia, dos sistemas biológicos micro-eletromecânicos, biossensores, microarrays e da engenharia de tecidos. A nanotecnologia é a responsável pelos avanços revolucionários da medicina, comunicação e robótica (EMERICH & THANOS, 2006).

O termo nanomedicina é designado para nanossistemas com propósitos biomédicos, e está inserida na nanotecnologia. Na atualidade, a nanomedicina é um dos ramos mais promissores da medicina contemporânea, retendo boa parte dos esforços científicos na busca de novos tratamentos para doenças infecciosas e para o câncer (PISON et al, 2006).

O principal objetivo da nanotecnologia farmacêutica é desenvolver sistemas carreadores contendo compostos bioativos, com adequada estabilidade, absorção, liberação controlada e transferência quantitativa e específica do fármaco ao órgão-alvo (SANTOS-MAGALHÃES et al, 2000).

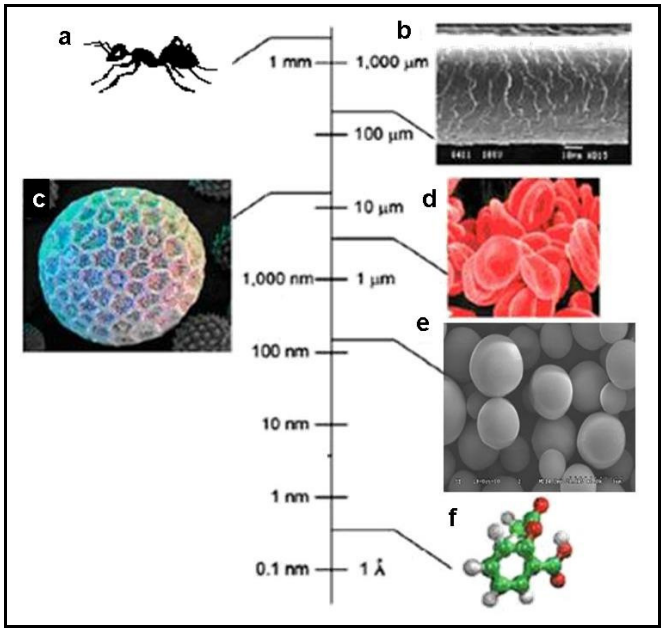


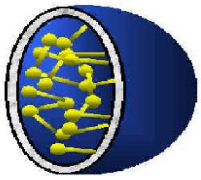
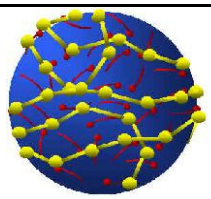
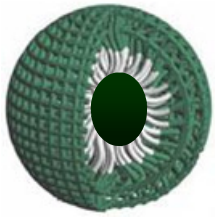
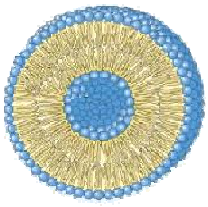
Figura 6. Ilustração do tamanho de pequenas estruturas (a) formiga, (b) fio de cabelo, (c) grão de pólen, (d) hemácia, (e) nanocápsulas polímerica, e (f) molécula da aspirina. Ilustração modificada de Emerich & Thanos (2006).

3.2-Sistemas terapêuticos de liberação controlada

A tecnologia de sistemas de liberação controlada de fármacos surgiu nas décadas de 80 e 90, com o intuito de favorecer a liberação controlada de fármacos, aumentando a eficácia terapêutica e minimizando os efeitos colaterais (ZHUANG et al, 2002). O controle da liberação de fármacos em sítios de ação específicos ocorre através da utilização de vetores, capazes de permitir a otimização da velocidade de cedência e do regime de dosagem das substâncias. Dentre os vetores, incluem-se as micropartículas e os sistemas coloidais (lipossomas e nanopartículas) (tabela 3) (SCHAFFAZICK et al, 2003).

Sistemas coloidais de liberação controlada de fármacos oferecem diversas vantagens em relação às formas de dosagens convencionais, seja porque protegem os princípios ativos lábeis da degradação e/ou inativação pelo suco gástrico e melhoram sua biodisponibilidade, ou determinam o aumento da penetração celular de substâncias hidrofílicas. Em decorrência do tamanho reduzido das partículas, as preparações coloidais prestam-se à administração parenteral, podendo assim ser úteis para a liberação controlada do princípio ativo em órgãos específicos ou sítios alvo do organismo. O direcionamento da substância biologicamente ativa ao sítio de ação desejado poderá, não somente melhorar a eficiência terapêutica, como também permitir a redução da quantidade do fármaco a ser administrada para obtenção da resposta biológica, minimizando os efeitos colaterais indesejáveis (MAGENHEIM & BENITA, 1991). Um sistema perfeito de liberação controlada de fármacos, embora ainda não alcançado, deve ser capaz de direcionar fármacos para o sítio alvo desejado, com a mínima exposição dos demais tecidos. Esse sistema de liberação de fármacos, por si só, deve ser farmacologicamente inativo, ter toxicidade mínima, ser prontamente metabolizado e depurado da circulação após ter exercido sua função. Além de ser confortável para o paciente, simples de se administrar e remover, fácil de fabricar e esterelizar (FORSSEN, 1998; ZHOU et al, 2002).

Tabela 3. Sistemas de liberação controlada de medicamentos.

Sistema	Descrição	Ilustração	Referência
Microcápsulas	Constituída por fina parede polimérica que envolve uma cavidade oleosa interna. Tamanho na escala micrométrica.		POHLMANN et al, 2002; ajetudes.club.fr/nano/images/nanoca2.jpg
Microesferas	Constituída por matriz polimérica, na qual o principio ativo está disposto. Tamanho na escala micrométrica.		POHLMANN et al, 2002; ajetudes.club.fr/nano/images/nanoca2.jpg
Nanocápsulas	Sistemas vesiculares em que o fármaco é confinado em uma cavidade interna, a qual é revestida por membrana polimérica. Tamanho na escala nanométrica.		NISHIOKA et al, 2001 ; magazine.wustl.edu/nanoparticles
Nanoesferas	Constituída por matriz polimérica densa, na qual o fármaco fica disperso. Tamanho na escala nanométrica.		NISHIOKA et al, 2001 ; magazine.wustl.edu/nanoparticles
Lipossomas	Vesículas esféricas, constituídas por uma ou várias bicamadas lipídicas. Tamanho na escala nanométrica ou micrométrica.		TORCHILIN et al, 2005; NELSON & COX, 2000.

Até 1960, polímeros hidroliticamente instáveis eram considerados uma descoberta desastrosa. Entretanto, com o avanço das pesquisas, esses materiais passaram a despertar o interesse da medicina, especialmente devido à possibilidade de serem utilizados em implantes temporários e, na indústria farmacêutica, para liberação lenta de fármacos (SCHUGENS et al,1995). Os polímeros utilizados para a preparação de nanopartículas podem ser biodegradáveis, como o poliláctico (PLA), poliglicólico (PGA) e seus co-polímeros (PLGA), policaprolactona e os poliacrilatos, ou não biodegradáveis. Os poliésteres (PLA, PGA e

PLGA) são os mais utilizados para preparação de sistemas de liberação controlada de fármaco, pois são biodegradáveis e biocompatíveis (ABDELWAHED et al, 2006). Existem dois mecanismos primários pelos quais o princípio ativo pode ser liberado desses sistemas, podendo ocorrer isoladamente ou associados: difusão e erosão. Na difusão, a droga encapsulada pela membrana polimérica ou suspensa na matriz polimérica dissolve e difunde para fora do polímero. Na erosão, o polímero é degradado naturalmente pela hidrólise das ligações ésteres, liberando o fármaco (FAROKHZAD & LANGER, 2006). Na prática, copolímeros de ácido glicólico com l-láctico e d-l láctico são os mais utilizados em sistemas de liberação controlada, com vantagens. Uma delas é o menor tempo de degradação. Esse menor tempo de degradação se explica devido à amorfização provocada pela quebra da regularidade entre as cadeias monoméricas (BASSANI et al, 2001).

Poli(d,l-láctico-co-glicólico) (PLGA) é um poliéster alifático relativamente hidrofóbico, instável em condições úmida e biodegradável a subprodutos atóxicos (ácido láctico, ácido glicólico, dióxido de carbono e água) e produzidos a partir de recursos renováveis (SOARES et al, 2005). É um polímero termoplástico composto por um ou mais de três diferentes monômeros de hidroxi-ácidos, como ácidos d-láctico, l-láctico e/ou glicólico (JAIN, 2000). É um copolímero sintético e biocompatível, e a quantidade relativa de ácido láctico e glicólico irão determinar a cristalinidade e a taxa de hidrólise do polímero e conseqüentemente a velocidade da liberação do fármaco através da matriz polimérica (DESHPANDE et al, 1998). Em geral, pode ser processado em diferentes formas e tamanho (até 200nm), podendo encapsular moléculas de menor escala. E devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e a toxicicidade, esse polímero foi aprovado pelo "Food and Drug Administration (FDA)" (JIANGA et al, 2005). Neste, as unidades monoméricas são eliminadas pelo organismo através do ciclo de Krebs, como dióxido de carbono e água.

O processo de biodegradação do PLGA é descrito na literatura como uma sucessão de eventos (figura 7). Exposto aos fluidos aquosos do corpo, inicialmente o material sofre hidratação. Com a presença das moléculas de água, o processo de degradação dá-se através da hidrólise das ligações ésteres, originando produtos na forma de oligômeros (ou monômeros-PLA e PGA) solúveis e não tóxicos. A degradação prossegue por um processo biologicamente ativo (por enzimas) ou pela clivagem hidrolítica passiva (ELKE et al,2004). Terminada a hidrólise do material, inicia-se a oxidação a ácido láctico (PLA) e conversão das unidades de PGA em glicina, que por sua vez são convertidos em ácido pirúvico. Na presença da acetil coenzima A, ocorre a liberação de CO_2 e, conseqüentemente, a decomposição em citrato. O citrato será então incorporado no Ciclo de Krebs, resultando em CO_2 e H_2O, podendo sua

eliminação ser feita através da urina e da respiração. Dessa maneira, o material foi reabsorvido e metabolizado (ALI et al, 1993).

O termo nanopartículas aplicado à liberação controlada de fármacos é amplo e refere-se a dois tipos de estruturas diferentes, nanoesferas e nanocápsulas (tabela 3). Essas se diferenciam na organização estrutural e na morfologia. As nanoesferas são sistemas em que o fármaco encontra-se disperso ou solubilizado na matriz polimérica, obtendo-se um sistema monolítico, não sendo possível identificar um núcleo diferenciado. Enquanto as nanocápsulas constituem os sistemas reservatórios onde é possível identificar um núcleo diferenciado. Nesse caso, a substância pode estar dispersa na membrana polimérica ou dentro do núcleo interno (LIMAYEM et al, 2004). Nas ultimas décadas, o desenvolvimentos de nanopartículas vem recebendo maior atenção da comunidade científica, como sistema de liberação controlada de droga com fins terapêuticos. Esses sistemas permitem a liberação do fármaco ao órgão/tecido-alvo, aumentam a biodistribuição oral, permitem a manutenção das concentrações plasmáticas dentro do índice terapêutico, além de, prevenir a degradação enzimática da droga. As nanopartículas apresentam vantagens em relação aos sistemas microparticulados, como maior captura celular (ABDELWAHED et al, 2006).

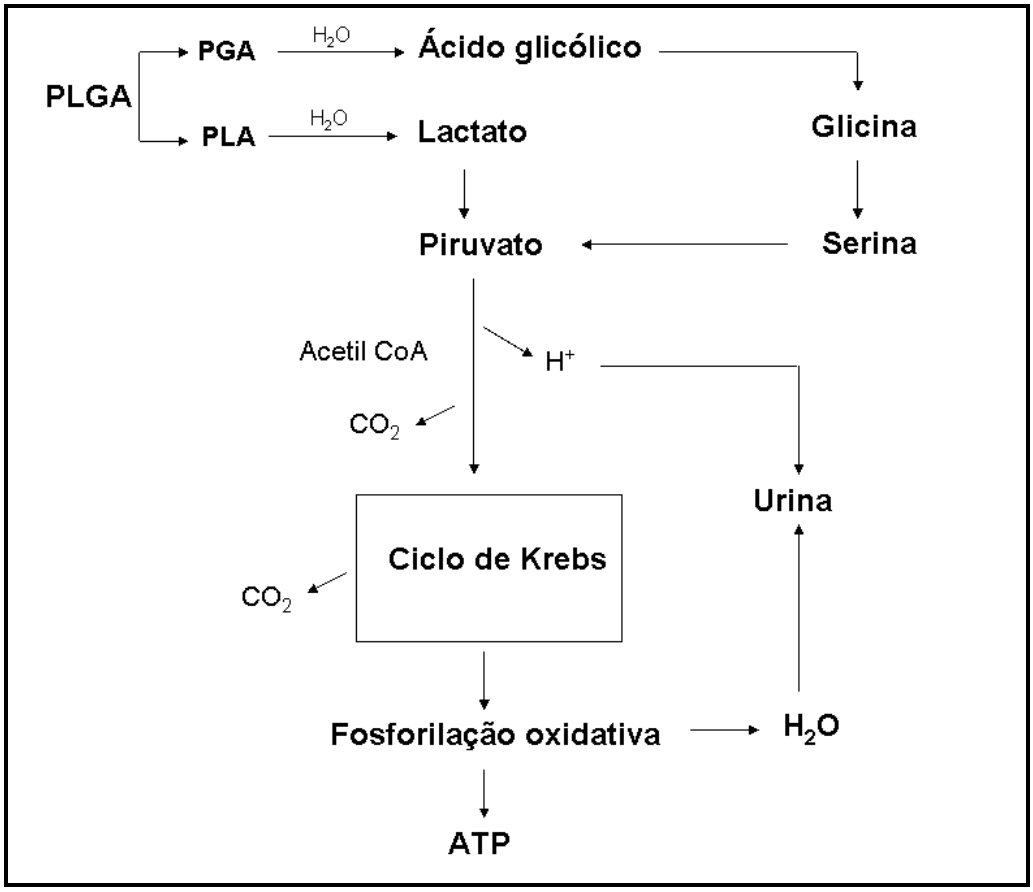


Figura 7. Esquema da degradação do PLGA *in vivo* (ALI et al, 1993).

Existem várias metodologias para preparação de nanopartículas poliméricas. Dependendo das características físico-químicas do fármaco, é possível escolher o melhor método e o polímero ideal (REIS et al, 2006). Abaixo seguem algumas das metodologias empregadas na preparação de nanopartículas poliméricas.

- *Polimerização em emulsão*: O iniciador é solúvel em água, enquanto o monômero é parcialmente solúvel. O emulsificante tem como objetivo formar micelas onde o monômero fica contido. Algumas micelas são ativas, ou seja, a reação de polimerização se processa dentro delas, enquanto outras são inativas, constituindo apenas uma fonte de monômero. À medida que a reação ocorre, as micelas inativas suprem as ativas com monômero, que crescem até formar os polímeros. É um método de preparação de nanopartículas rápido e se divide em dois grupos, de acordo com a natureza do solvente da fase contínua:

1. Fase contínua orgânica: Consiste na dispersão de monômeros em uma emulsão ou microemulsão inversa, ou em um material no qual o monômero não seja solúvel. Nessa fase do processo, utiliza-se um tensoativo para prevenir a agregação. O tensoativo é solubilizado em solvente orgânico como ciclohexano, n-pentano e tolueno, constituído a fase orgânica (REIS et al, 2006).
2. Fase contínua aquosa: o monômero é dissolvido em uma fase contínua aquosa não sendo necessária a presença do tensoativo. A polimerização pode ser iniciada por diferentes mecanismos. O processo inicia-se quando o monômero é disperso em uma fase coloidal contínua contendo a molécula inicializadora que pode ser um íon ou um radical livre. A fase de separação e de formação das nanoesferas pode ocorrer antes ou após o final da polimerização (VAUTHIER et al, 2003).

- *Polimerização interfacial*: Nessa técnica, a polimerização ocorre na interface entre dois solventes imiscíveis. O polímero é formado *in situ*, e a membrana polimérica envolve uma fase interna óleo/água ou água/óleo (COUVREUR et al, 2002).
- *Precipitação de polímeros pré-formados:* Essa metodologia apresenta como principal vantagem a ausência de resíduos de monômeros, como ocorre nos processos de polimerização. São vários os métodos de preparação de nanopartículas a partir de polímeros pré-formados:

1. Emulsificação / Evaporação do solvente: Essa metodologia envolve duas etapas. Primeiramente, o polímero é dissolvido em uma solução aquosa (formação da emulsão). Em seguida, o solvente é evaporado induzindo a precipitação do polímero como nanoesferas (SOPPIMATH et al, 2001).

2. Deslocamento do solvente e deposição interfacial: Esses processos consitem na precipitação do polímero de uma solução orgânica, e difusão do solvente orgânico no meio aquoso, geralmente na presença de um tensoativo (FESSI et al, 1989). A técnica de deslocamento do solvente é utilizada para preparação de nanocápsulas e nanoesferas, de acordo com a presença ou ausência de óleo, respectivamente. E consiste na solubilização do polímero em um solvente orgânico, com posterior injeção em uma solução aquosa, sob agitação, contendo o tensoativo. O polímero é depositado na interface entre a água e o solvente orgânico, causando rápida difusão do solvente seguido da instantânea formação da suspensão coloidal (REIS et al, 2006). O óleo precisa ser solúvel no mesmo solvente do polímero, mas imiscível com a mistura. A junção da solução orgânica (óleo, polímero e solvente orgânico) é injetada na mistura aquosa contendo o tensoativo. Nesse caso, a deposição do polímero ocorre na interface entre as gotículas de óleo dispersas e a fase aquosa, formando as nanocápsulas (FESSI et al, 1989; REIS et al, 2006).

3.3 – Nanocápsulas

As nanocápsulas (tabela 3) são partículas sólidas que apresentam uma cavidade interna de natureza oleosa, estabilizadas por um filme interfacial de agentes tensoativos e revestidas, superficialmente, por uma parede polimérica irregular pouco espessa. Essa parede pode ser responsável pela estabilidade da partícula no meio coloidal e pelo controle da liberação do fármaco (NISHIOKA et al, 2001). Esses sistemas apresentam vários atributos. Primeiro, quando se associam agentes bioativos a esses nanocarreadores, há redução da dosagem, alteração da farmacocinética e aumento da biodistribuição do fármaco nos órgãos-alvo, resultando em melhor eficácia terapêutica. Segundo, a toxicidade da droga é reduzida como conseqüência do acúmulo de princípio ativo no órgão de destino e menor concentração no tecido sadio. E terceiro, as nanocápsulas aumentam a solubilidade de componentes hidrofóbicos em meio aquoso, além de propiciarem um elevado potencial de interação com as superfícies biológicas, devido à sua habilidade de bioadesividade (ARANGOA et al, 2000; KOO et al, 2005).

4.4 - Associação do ácido úsnico em carreadores poliméricos

Os empecilhos para a aplicação terapêutica do ácido úsnico, como hepatotoxicidade, insolubilidade em água e consequentemente baixa eficácia, podem ser superados por sua associação com sistemas poliméricos de liberação controlada, a mais nova ferramenta da

tecnologia farmacêutica. Estudos pioneiros com a encapsulação do ácido úsnico oferecem novas perspectivas para sua utilização no tratamento do câncer e da tuberculose.

Ribeiro-Costa e colaboradores (2005) desenvolveram e caracterizaram microesferas de PLGA contendo o ácido úsnico. Posteriormente, avaliando a atividade antitumoral do ácido úsnico encapsulado nas microesferas, observaram a inibição de 63% no crescimento do tumor sarcoma-180, em ensaios *in vivo*. Enquanto o ácido úsnico livre inibiu o crescimento tumoral em 42%. Observando que a microencapsulação do ácido úsnico potencializou seu efeito antitumoral. No mesmo ano, Santos et al (2005), encapsulou o ácido úsnico em nanocápsulas de PLGA e avaliou o efeito citotóxico *in vitro* dessa substância contra células cancerígenas NCI-H 292 e Hep-2. Nesse estudo averiguou-se que quando associado às nanocápsulas de PLGA, o ácido úsnico mostrou-se mais ativo em relação à sua forma livre.

Em 2006, Santos e colaboradores, estudaram a atividade antitumoral *in vivo* do ácido úsnico encapsulado em nanocápsulas de PLGA. Tumor sarcoma-180 foi implantado em camundongos, e então, realizada a quimioterapia durante sete dias consecutivos por via intraperitoneal (i.p.). Ao final dos experimentos observou-se que os animais do grupo tratado com o ácido úsnico livre apresentaram inibição do crescimento tumoral em 43,3 ± 4% em relação ao grupo controle. Enquanto que, nos animais do grupo tratado com as nanocápsulas de PLGA contendo o ácido úsnico foi visualizada uma inibição do crescimento tumoral em 69,7 ±6% em relação ao controle. Assim, esses resultados confirmam a potencialização da atividade antitumoral do ácido úsnico quando associados à sistemas poliméricos de liberação controlada.

Em ensaio de toxicidade sub-crônica *in vivo*, observou-se elevação das enzimas hepáticas, aminotransferases, após tratamento com o ácido úsnico, confirmando a hepatotoxicidade causada por essa substância. No entanto, quando na forma nanoencapsulada (nanocápsulas de PLGA) esses danos hepáticos foram reduzidos. Esse relato foi confirmado nesse mesmo estudo, em que a injúria hepática foi reduzida avaliando o corte histológico do tecido hepático. O tecido hepático dos animais tratados com o ácido úsnico livre, apresentavam extensas áreas de necrose. Enquanto, que a histopatologia hepática dos grupos tratados com nanocápsulas de PLGA contendo o ácido úsnico, revelou pequenas áreas de necrose (SANTOS et al, 2006). Esses achados demonstram que a nanoencapsulação reduz os efeitos tóxicos do ácido úsnico.

-

II - OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Determinar a atividade antimicobacteriana do ácido úsnico em um sistema carreador na forma de nanocápsulas de copolímero biodegradável de ácido lático e glicólico (PLGA), visando a possível aplicação na terapia da tuberculose.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Encapsular o ácido úsnico em nanocápsulas de copolímero de ácido lático e glicólico (50/50), utilizando óleo de soja como fase oleosa interna;
- Caracterização físico-química das nanopartículas:
  - → Microscopia de força atômica;
  - → Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho;
  - → Análise Térmica.
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv;
- Determinar a atividade intracelular contra macrófagos J774 infectados com *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

III – ARTIGO CIENTÍFICO

Manuscrito a ser submetido à revista científica Phytomedicine.

Physicochemical characterization and antimycobacterial activity of usnic acid-loaded nanocapsules

M.S.O. Wanderley[a,b], A.O. Souza[c], N.P. Santos[d], E.C. Pereira[e], N.H. Silva[b], A. Isenmann[f], G. M. Rocha[g], G. Weissmüller[g], M.L. Bianconi[h], C.L. Silva[c] , N.S. Santos-Magalhães[a,b,*]

[a]*Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901, Recife- PE, Brasil*

[b]*Departamento de Bioquímica, UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, 50670-420, Recife-PE, Brasil*

[c]*Universidade de São Paulo (USP), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Departamento de Bioquímica e Imunologia, Av Bandeirantes, 3900, 14049-900, Ribeirão Preto-SP, Brasil*

[d]*Centro Acadêmico de Vitória, UFPE, Alto do reservatório, Bela Vista, 50010-921, Vitória de Santo Antão-PE, Brasil*

[e]*Departamento de Ciências Geográficas, UFPE, Av. Acadêmico Hélio Ramos, Cidade Universitária, 50740-530, Recife-PE, Brasil*

[f]*Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Av. Brigadeiro Trompowski, Ilha do Fundão, 21944-970, Rio de Janeiro-RJ, Brasil*

[g]*Laboratório de Física Biológica, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, Av. Carlos Chagas Filho , Ilha do Fundão, 21941-902, Rio de Janeiro-RJ, Brasil*

[h]*Laboratório de Biocalorimetria, Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro-RJ, Brasil*

***Corresponding author:**

Dr. Nereide Stela Santos Magalhães

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Grupo de Sistemas de Liberação Controlada de Medicamentos

Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA)

Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária,

50670-901, Recife, PE, Brazil

Tel: +55-81-21268587; fax: +55-81-21268485

E-mail address: nssm@ufpe.br

Abstract

This study reports the physicochemical characterization of the usnic acid-loaded nanocapsules of D,L-(lactide-glycolide) copolymer (PLGA) and their *in vitro* antimycobacteial activity. The usnic acid-loaded nanocapsules (UA-NC) infrared spectrum showed an absorption band at 1750 cm^{-1} assigned to PLGA ester groups. The bands at 1635 and 1190 cm^{-1} are due to aromatic ketone group and phenyl group of the usnic acid (UA), respectively. Differential scanning calorimetry analysis of UA-NC revealed a transition phase at 45.5 °C with an enthalpy change of 23.8 J/g, while UA presented a single endothermic transition of fusion at 201.7 °C with an enthalpy change of 85.2 J/g. UA encapsulation occurred thus without an interaction at molecular level with the polymer. Thermogravimetric analysis of usnic acid-loaded nanocapsules and empty nanocapsules (NC) showed two-step degradation, whereas the UA presented a single decomposition phase. No loss of weight in UA-NC or NC was observed up to 50 °C suggesting that both samples were stable at this temperature. The susceptibilities of the *M. tuberculosis* to free and nanoencapsulated UA were 7.98 and 3.83 μg/mL, respectively. The analysis of intracellular activity revealed that an increase of 30 % in the antimycobacterial activity of UA was achieved for the nanoencapsulated dosage form. In this way, the encapsulation of UA into nanocapsules improved its *in vitro* antimycobacterial effectiveness.

Keywords: Usnic acid, nanocapsules, thermal analysis, antimycobacterial activity, *Mycobacterium tuberculosis*.

Introduction

Tuberculosis is one of the foremost infectious diseases, nowadays world-spread in approximately one-third of the human population, and its incidence is currently increasing, particularly in association with the AIDS pandemia (Niveau, 2006). The HIV infection is the highest risk factor identified for a latent tuberculosis infection proceeds to an active disease (Dietrich et al. 2006).

Rifampicin, isoniazide, streptomycin and pyrazinamide are the leading front-line drugs in the treatment of tuberculosis. Nevertheless, they require a high-dose drug treatment over a minimum period of 6–12 months, which is routinely associated with serious and undesirable side effects. It has long been recognized that toxic effects may be produced by the high level of the drug in blood that is required to achieve an effective intracellular drug concentration (Agrawal et al. 2000). Reasons for failure of chemotherapy may possibly include a poor patient compliance, some degradation of drugs before reaching their action of site and its low permeability (Labana et al. 2002; Dutt and Khuller, 2001). Furthermore, the incorrect use of antibiotics has mainly contributed to the appearance of multiresistance of *Mycobacterium tuberculosis* (Nguyen and Thompson, 2006). Certainty a huge therapeutic issue in the 21st century will be the multiresistance of microorganisms caused by the abusive use of antibiotics through this half a century of antibiotic era. Therefore, it seems to be crucial to invest in two promising strategies for the chemotherapy of tuberculosis. The first one is the search for new natural or synthetic compounds with antimicobacterial activity. On the other hand, the rescue of old-discovered drugs by evoking new dosage forms may also constitute an efficient therapeutic strategy. A functional and current strategy for enhancing therapeutic effects of available drugs is to entrap it in a delivery system from which they are slowly released over extended periods of time. The controlled release of antimycobacterial agents may be accomplished by taking advantage of various polymeric drug carriers (Dutt and Khuller, 2001).

The ability to treat intracellular infections including tuberculosis may strongly depend on the concentration of the drug inside macrophages. As a consequence, it has been proposed that association of antibiotics with colloidal drug carriers, which improve the intracellular target caused by their taken up by the mononuclear phagocitic system (Fawaz et al. 1998). Additionally, controlled drug delivery systems can be used in tuberculosis therapy as it reduces the dosing schedule of drugs, greatly increasing the patient compliance. In fact, different drug carrier systems such as liposomes, microspheres and nanoparticles have been

used to improve the efficace of antimicrobial agents (Labana et al. 2002, Makino et al. 2004, Pandey and Khller, 2004). Nanoencapsulation technology using various types of polymers could be used to deliver the required doses for prolonged time periods by a single shot, without causing toxicity (Reis et al. 2006). Recently, poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles were explored as suitable carrier systems of antitubercular drugs (Sharma et al. 2004).

Ever since the 50's, a number of studies have been investigated the antimicrobial of lichen compounds, specially the antimycobacterial activity (Vartia, 1973). *Cladonia* species extracts have been shown to be effective in the treatment of pulmonary tuberculosis (Chung et al. 1995). Usnic acid (figure 1) is a key secondary metabolite of several lichens species, which is responsible for the antimicrobial activity of lichens against gram-positive microorganisms (Ingolfsdóttir et al., 1998). The usnic acid, discovered in the middle of 1900's, held antimicrobial activity over a broad-range of microorganism species. The (-)-usnic acid was previously related to exhibit inhibitory activity against tubercle bacilli strains at a titre of 1:60 000 (16.6 μg/ml) (Vartia, 1950) and, the (+)-usnic acid from *Cladonia arbuscula* exhibited the highest activity with a MIC value of 32 μg/ ml against *Mycobacterium aurum*, a non-pathogenic organism with a similar sensitivity profile to *M. tuberculosis* (Ingólfsdóttir et al. 1998). However, it was rather disused mainly due to its high toxicity (Han et al. 2004), but nowadays a new interest on this compound came to light, which is corroborate by an increasing number of publications concerning usnic acid biological properties (Müller, 2001; Campanella et al. 2002; Ribeiro-Costa et al. 2004; Santos et al. 2005, De Carvalho et al. 2005; Santos et al. 2006; Odabasoglu et al. 2006). Many reasons have contributed to a virtual abandon of usnic acid as a potential therapeutic drug. Firstly, its main drawback concerns a high *in vitro* and *in viv*o toxicity. Secondly, the low water solubility of usnic acid has somewhat limited its application in clinical therapy.

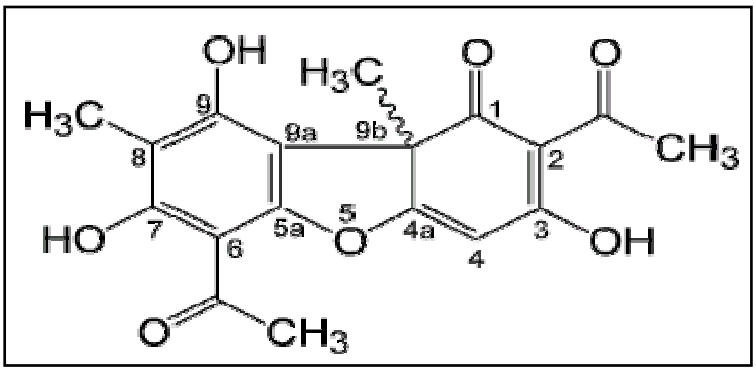


Figure 1. Structure of usnic acid.

Keep in mind the issues of tuberculosis chemotherapy, this study was carried out to examine the antimycobacterial activity of usnic acid-loaded nanocapsules against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv strain. Furthermore, the structural, morphological and thermal characteristics of nanocapsules were evaluated.

Materials and methods

Chemical and drugs

Poly(d,l-lactic-co-glycolic acid) (PLGA 50:50) was purchased from Birmingham Polymers (Alabama, USA); soybean phosphatidylcholine (Epikuron® 200) was obtained from Lucas Meyer (Germany); poloxamer 188 was generously supplied by ICI (France); rifampicin, Tween 80®, Alamar blue, soybean oil, threalose and (+)-usnic acid were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA); monobasic potassium phosphate, sodium hydroxide, methanol, dimethyl sulfoxide (DMSO) and analytical grade solvents were obtained from Merck (Darmstadt, Germany).

Microorganism

Mycobacterium tuberculosis $H_{37}Rv$ (ATCC 27294) was maintained on a Lowenstein-Jensen medium at 37 ºC. Before handling, the *M. tuberculosis* was cultured in Middlebrook 7H9 broth and incubated at 37 ºC for approximately 10 days and its concentration adjusted to a bacterial density corresponding to 1.0 McFarland turbidity standard (1×10^7 mycobacteria/mL), which was further adjusted to (4×10^5 mycobacteria/mL) in Middlebrook 7H11 medium before inoculation.

Formulation of usnic acid-loaded nanocapsules

Formulation of usnic acid-loaded nanocapsules (UA-NC) was previously (Santos et al. 2005). Briefly, the polymer, the soybean oil, the usnic acid and the soya phospholipid were each dissolved in acetone. All these organic solutions were then mixed and maintained at room temperature under magnetic stirring at 150 rpm for 10 min. The aqueous phase consisted of the poloxamer® 188 and 10% threalose dissolved in 50 ml of a phosphate buffer solution (pH 7.4) at 0.2 M. Next, the organic solution was gradually dropped into the aqueous phase under magnetic stirring at 150 rpm for 30 min. Nanocapsules were produced as the acetone was removed under reduced pressure at 40 ºC. The colloidal suspension was

concentrated to a 10 ml final volume by removing the water in similar conditions. Finally, the nanocapsules formulation was lyophilized, conditioned in sealed vials and stored at 4 ºC.

Characterization of usnic acid-loaded nanocapsules

Atomic force microscopy

The shape and surface morphology of the dried manufactured nanocapsules were investigated by atomic force microscopy (MFP-3D, Asylum Research – Santa Barbara, CA, USA). AC240TS cantilevers (Olympus, Tokyo, Japan) were used in intermittent contact mode. Such cantilevers have a nominal spring constant of 2 N/m; however measurements by the thermal noise method yielded 1.3 N/m. Images were acquired at a 0.60 Hz scan rate, after the fixation of the sample on mica.

Infrared spectroscopy

The chemical interaction between drug and polymer was analyzed by infrared spectroscopy using an ABB spectrometer (model FTLA 2000) in the region from 400 to 4000 cm^{-1}. Samples (free usnic acid, usnic acid-loaded nanocapsules, and empty nanocapsules) were grinded with KBr so as to obtain a concentration of about 5 % (w/w).

Thermal analysis

Differential scanning calorimetry analysis (DSC)

The DSC scans were measured using a DSC Q-1000 (T.A Instruments, USA), from 25 to 220 ºC at a scan rate of 10 ºC/min in a nitrogen atmosphere (50 mm/min).

Thermogravimetric analysis (TGA)

The TGA analysis was run through a Q-500 (TA Instruments, USA) in which the change of weight was determined as a function of the temperature (25-700 ºC), in controlled atmosphere of nitrogen and a heating rate of 10 ºC/min. This analysis was carried out with samples of free usnic acid (powder), usnic acid-loaded nanocapsules and empty nanocapsules (lyophilized form). The differential thermogravimetric curve (DTG) was calculated by the first derivative of TGA of each sample.

Antimycobacterial activity of usnic acid-loaded nanocapsules

Minimum Inhibitory Concentration

Assays of the minimum inhibitory concentration (MIC) of free and encapsulated usnic acid were performed as described by Collins and Franzblau (1997). Samples of usnic acid were

diluted in 0.2% DMSO and nanocapsules were dispersed in sterile phosphate buffer solution (pH 7.4) to obtain solutions at a concentration of 125 µg/ml. A 100-µl aliquot of free usnic acid and usnic acid-loaded nanocapsules were added to the first well and, after that, a serial twofold dilution was made transferring 100 µl from the first to the last well, producing a final concentration of 0.06 µg/ml; the subsequent dilutions were carried out with 7H9 broth medium. After dilution, 100 µl of microorganism suspension (4×10^5 mycobacteria/ml) was added to each well and the final volume was 200 µl. Plates were incubated at 37ºC for 6 days. Next, 25 µl of freshly prepared 1:1 mixture of 10% Alamar blue and 10% Tween 80 were added to each well and the plates were reincubated overnight. A color change from blue to pink indicated bacterial growth. The MIC was defined as the lowest concentration able to inhibit the growth of microorganisms. Negative (0.2% DMSO) and positive (rifampicin 0.002 - 8 µg/mL) controls with were performed.

Intracellular activity

The intracellular antimycobacterial activity of free and usnic acid-loaded nanocapsules on infected macrophages was evaluated according to Oh et al. (1995). A suspension of macrophages J774 from cultured cells was adjusted to 5×10^5 cells/mL in the culture medium RPMI 1640 supplemented with 2.5% fetal cow serum. The macrophages suspension was then distributed in a 24-well plate (1 mL/well). After incubation at 37 °C for 12 hours the culture medium was substituted by 1 mL of RPMI containing *M. tuberculosis* H37Rv (5×10^6 mycobacteria). The plate was then incubated at 37 °C for 4 h to provide macrophage infection by *M. tuberculosis* (1 macrophage: 10 micobacteria). After infection the culture medium was removed and the macrophages were cautiously washed with 1 mL of PBS solution to remove extracellular phagocyted mycobacteria. An amount of 1 mL of usnic acid (0.32 to 12.8 µg/mL) and usnic acid-loaded nanocapsules (0.32 to 6.4 µg/mL) samples were then added to each well. The plate was incubated at 37 °C for 72 hours. A Positive control with rifampicin was carried out in a concentration 10 and 20 µg/mL, which is high enough to assure the intracellular mycobacteria kill. A negative control with non-infected and non-treated macrophages (cultured with DMSO 0.6%) was also performed.

The lyses of macrophages were achieved with 1 mL of SDS after culture medium withdrawing, and washed with 1 mL PBS to eliminate sample residues. After the lyses of macrophages (10-15 minutes), the lysate was diluted to 50, 200 and 400 fold and an aliquot of

100 µL were spread into plates containing solid culture medium agar 7H11. Plates were incubated at 37 °C (5% CO_2) for 15-20 days. As usual, the colony formation units (CFU) were counted and expressed as log values.

Results and Discussion

Atomic force microscopy

Atomic force microscopy (AFM) has been widely applied to investigate the morphology of nanoparticles (Ferdous et al., 1998; Feng and Huang, 2001) because its provides three-dimensional surface-dependent informations on the nanometer scale with very high resolution in different environments. AFM photographs of usnic acid loaded-nanocapsules showed that there was no aggregation or adhesion among nanocapsules (Fig. 2a, c). It was shown that the produced nanoparticles were almost in a spherical shape with a smooth and rigid surface and, no usnic acid crystals were found in the samples (Fig. 2b, d).

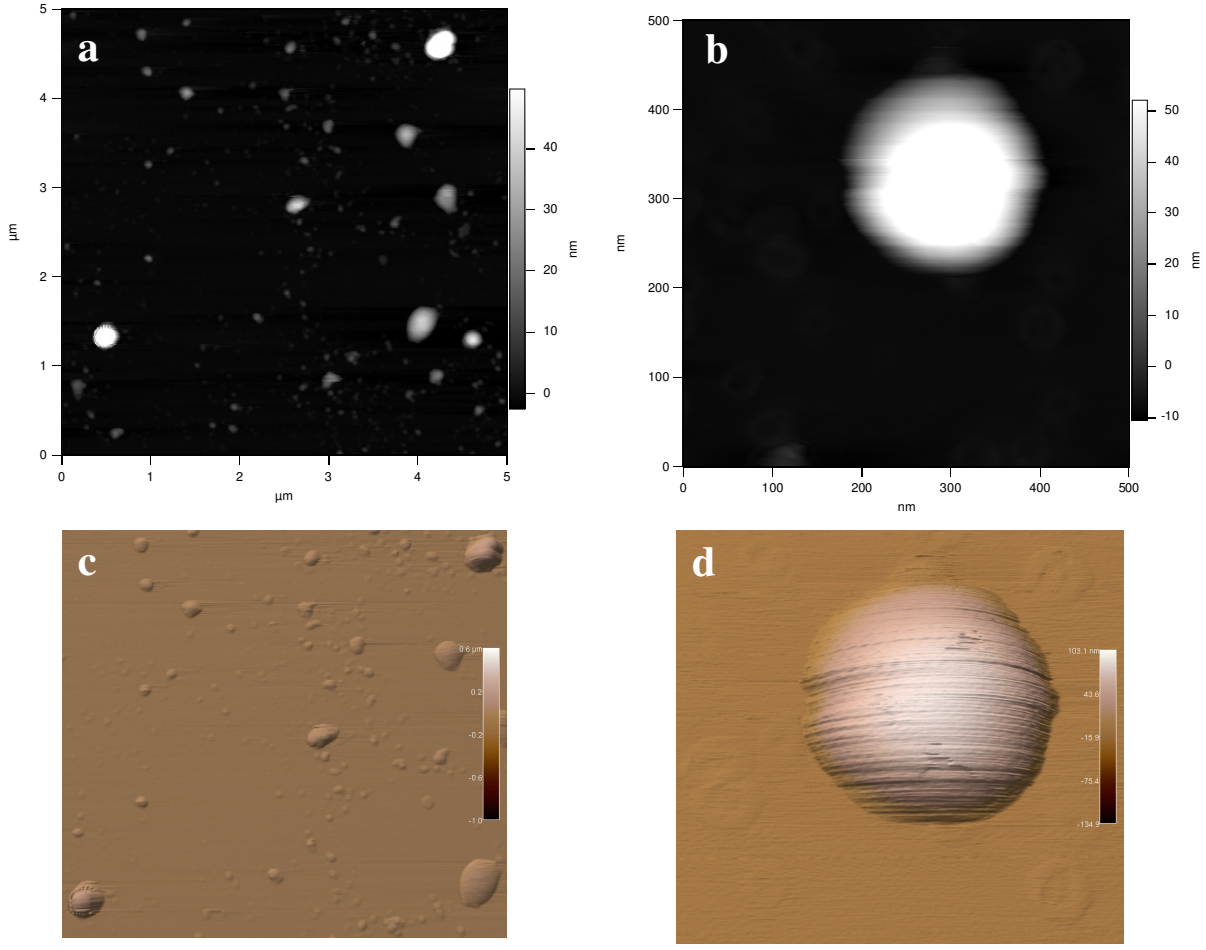


Fig. 2. Atomic force microscopic images of usnic acid-loaded PLGA nanocapsules. Figures a (5 ×5 µm) and b (500 × 500 nm) represent height images of nanocapsules, and c and

d illustrate their respective tridimensional images. The scale bars represent the difference of height.

Characterization of of usnic acid-loaded nanocapsules

Infrared spectroscopy

To examine the interaction of usnic acid with the polymer within the nanocapsules infrared spectroscopy was used. Fig.3 compares the IR spectra of the free usnic acid, usnic acid-loaded nanocapsules and empty nanocapsules. The absorption band at 1750 cm^{-1} is assigned to ester groups present in the PLGA copolymer. The bands at 1635 and 1190 cm^{-1} are due to aromatic ketone group and phenyl group of the usnic acid, respectively. The specific absorption usnic acid bands are not observed in the nanocapsules spectrum due to its low percentage in relation to the polymeric material. Moreover, all the characteristic bands of the pure polymeric material are present in the nanocapsules spectra. This can be seen as an evidence that a considerable percentage of the wall polymer has no specific chemical interactions with the core material of nanocapsules. On the other hand, from the enhanced complexity of the nanocapsules spectrum, interactions to happen between a minor part of the polymer and the usnic acid cannot be excluded.

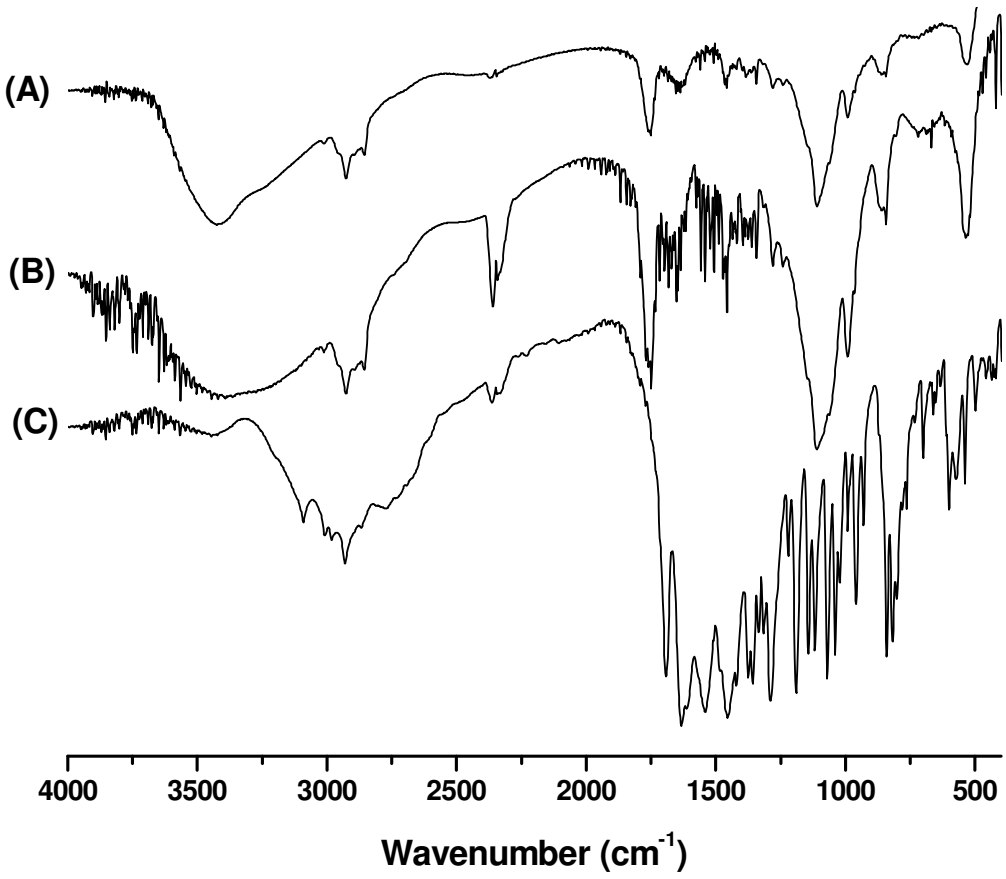


Fig 3. Infrared spectra of usnic acid-loaded nanocapsules (A), empty nanocapsules (B) and usnic acid (C).

Thermal analysis

Differential scanning calorimetry

DSC analysis of the empty nanocapsules (Fig 4) showed two distinct peaks: an endothermic transition at 45.6 °C, corresponding to the PLGA glass transition temperature with an enthalpy of 23.8 J/g, and an exothermic broad peak observed at 182.2 °C (165.1 to 202.4 °C) with enthalpy change of - 41.7 J/g. This transition can be attributed to the trehalose fusion as previously reported (Teixeira et al., 2005). The thermogram of usnic acid-loaded nanocapsules showed a thermal event at 45.5 °C with enthalpy change of 23.8 J/g, which corresponds to the glass temperature (Tg) of PLGA. It also exhibits endotherm corresponding to the dehydration of threalose as well as to the melting point of usnic acid. The thermogram of usnic acid presents a single endothermic transition of fusion at 201.7 °C with an enthalpy

change of 85.2 J/g. The encapsulation of usnic acid seems therefore not affect the thermotropic profile of the PLGA nanocapsules.

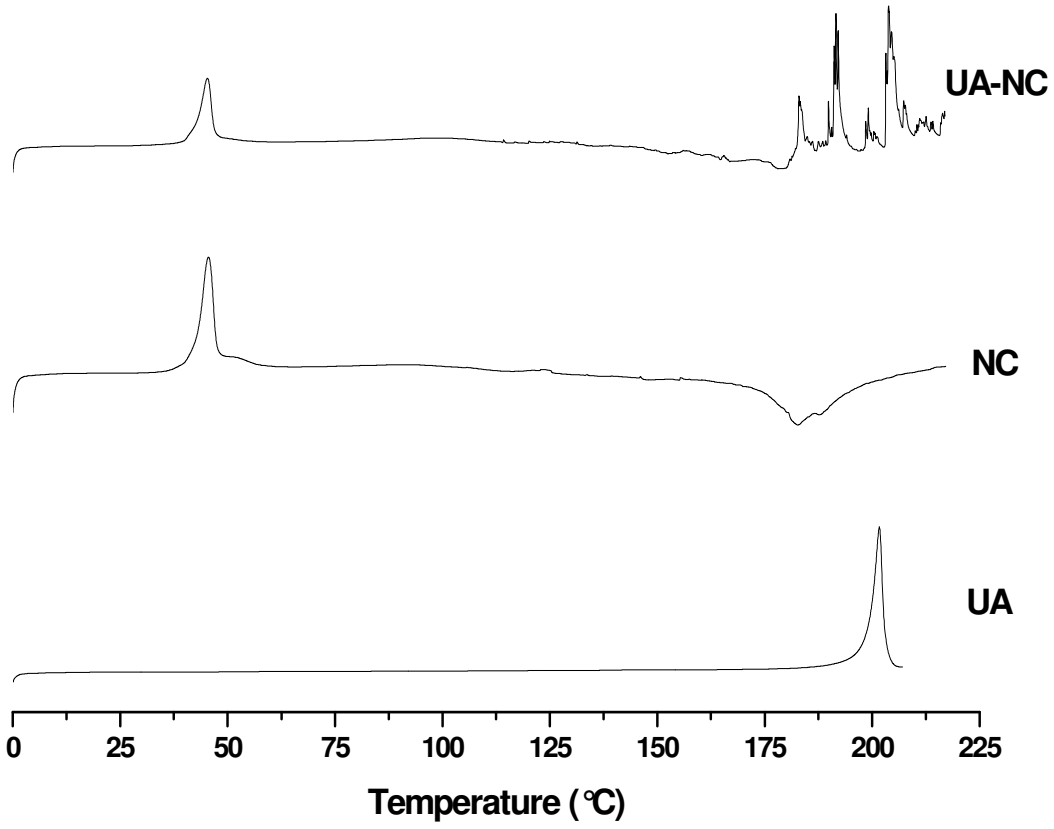


Fig. 4. Differential scanning calorimetric curves of free usnic acid (UA), empty nanocapsules (NC) and usnic acid-loaded nanocapsules (UA-NC).

Thermogravimetric analysis

Thermogravimetric analysis (TGA) is imperative for the polymer characterization and it has been used to get insights into interactions between polymers and drugs in drug delivery systems. In this way, helpful information can be obtained regarding the morphology of the polymer, the state of solid or molecular dispersion of the drug associated with these systems (Schaffazick et al. 2003).

TGA for samples of usnic acid-loaded nanocapsules and empty nanocapsules had shown a two-step degradation, whereas the UA presented a single decomposition phase (Fig.5 insert). No loss of weight in UA-NC or NC was observed up to 50 °C suggesting that both samples were thermally stable in this temperature. In the first phase of the nanocapsules (NC and UA-NC) degradation there is an endothermic peak, which indicates a dehydration process. In this step, the DTG analysis exhibits a loss of mass of 4.5 % and 7.7 % in the UA-NC and NC samples, respectively (Fig. 5). In the second phase of the thermal decomposition (185 to 510

^{o}C), a more significant loss of weight occurred in both samples (56.3 % in UA-NC, and 54.7 % in NC). In the 510-700 °C range, no loss of weight was observed for these samples, although about 35 % of residues was remaining. The UA sample remained stable until 170 °C. The main thermal transition was observed between 183 and 386 °C, where three distinct peaks could be observed at 213, 290 and, 309 °C. The main degradation step was related to a 70 % decomposition of the UA, being the major weight loss (around 55 %) at 290 ^{o}C. In the temperature range of 387-700 °C, there is a slow decomposition probably due to a number of non identified constituents of UA.

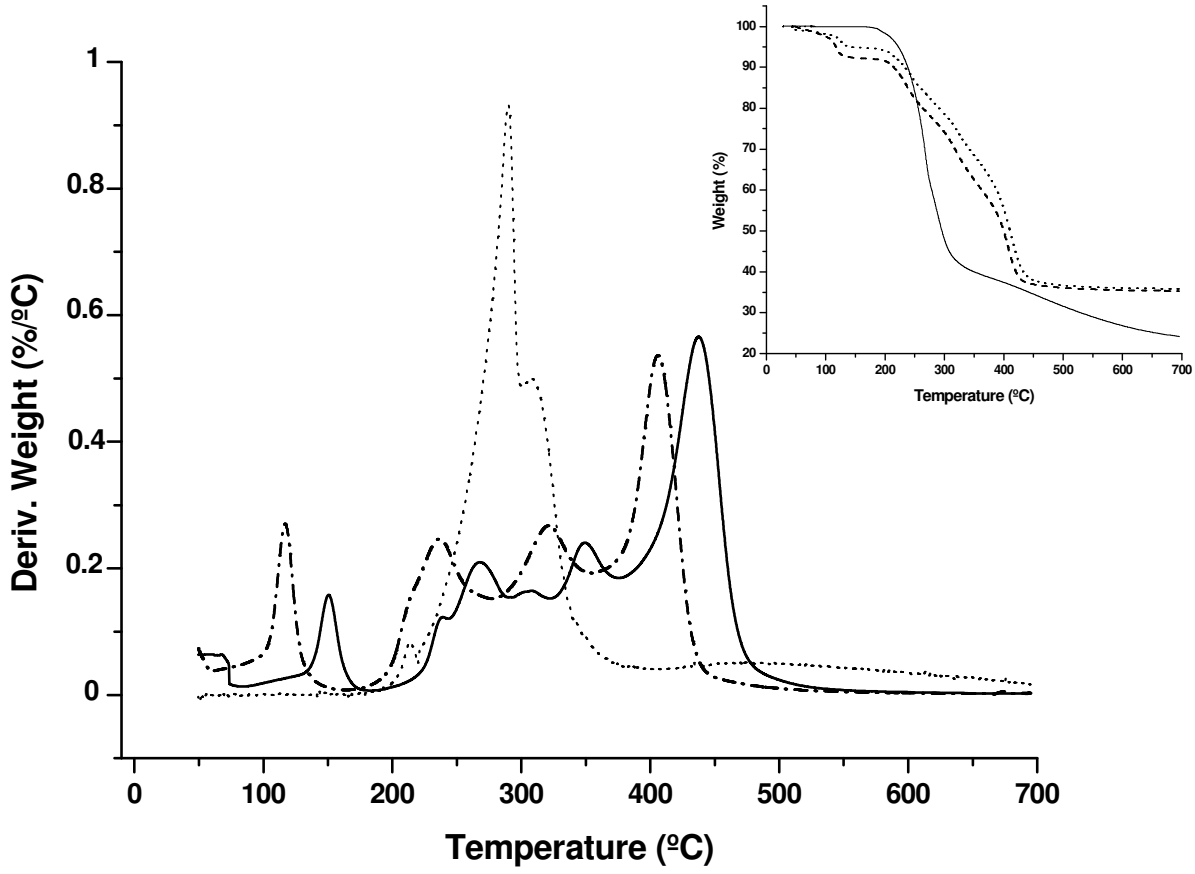


Fig. 5. Differential thermogravimetric curves of free usnic acid (····· UA), empty nanocapsules (--- NC) and usnic acid-loaded nanocapsules (– UA-NC). The insert showed the TGA diagrams of the free usnic acid (–UA), empty nanocapsules (--- NC) and, usnic acid-loaded nanocapsules (····· UA-NC) in the range from 25 to 700 ºC.

No significant change in the degradation profile (position of the peaks) or in the degree of degradation (percentage of weight loss) in each temperature was observed with the UA-NC

sample when compared to UA and NC samples. This suggests that the UA encapsulation occurs without an interaction at molecular level with the polymer within the nanocapsules.

Antimycobacterial activity

Minimum Inhibitory Concentration

One week after inoculation, the results for the visually determined MICs were obtained using alamar Blue dye, which is a general indicator of cellular growth and/or viability the blue, nonfluorescente, oxidized form, becomes pink and fluorescent upon reduction the present of *Mycobacteria* (Souza et al. 2001).

The MIC of usnic acid free was 7.98 μg/mL, compared this result for antimycobacterial drug reference, MIC: 0.0047 μg/mL, shows that the potency of usnic acid is considerably low-grade. Usnic acid was previously reported to be active against *M. tuberculosis* var. *hominis* and var. *bovis* at dilutions of 1:400000-1:200000, MICs: 2.5 - 5.0 μg/mL (Stoll, 1950). Vartia (1949) reported that usnic acid inhibited *Tubercle bacilis* strains 2132 and 2247 at a titer of 1:60000, MIC: 16.6 μg/mL. The usnic acid solubilized in DMSO exhibited activity against *Mycobacterium aurum* with an MIC value of 32 μg/mL (Ingólfsdóttir et al. 1998). The MIC of UA-NC was 3.83 μg/mL, revealing that the nanoencapsulation was more potential than free form of usnic acid and a lower dose is required for efficacy.

Intracellular activity

Figure 5 show the log CFU obtained in macrophages infected with *M. tuberculosis* after chemotherapy with UA and UA-NC. Both treatments resulted in a significant clearance of bacilli as compared to controls. The free usnic acid (Fig. 6a) administered at dose of 6.4 μg/mL reduced the CFU to about 1.5 log units, whereas the same dose of UA-NC decreased to less 1.0 log unit of the CFU. In this way, it was observed that UA-NC showed higher activity than free usnic acid (Fig. 6b). The chemotherapy with RFP at 20 μg/mL showed less activity than UA-NC at 6.4 μg/mL. The encapsulation of the usnic acid within nanocapsules produced an increased potency against intracellular *M. tuberculosis*, in view of the fact that they enhanced the antibiotic effect by increasing the drug deposition within macrophages. Encapsulation of UA into PLGA nanocapsules brings to a remarkable improvement on its *in vitro* antimycobacterial effectiveness.

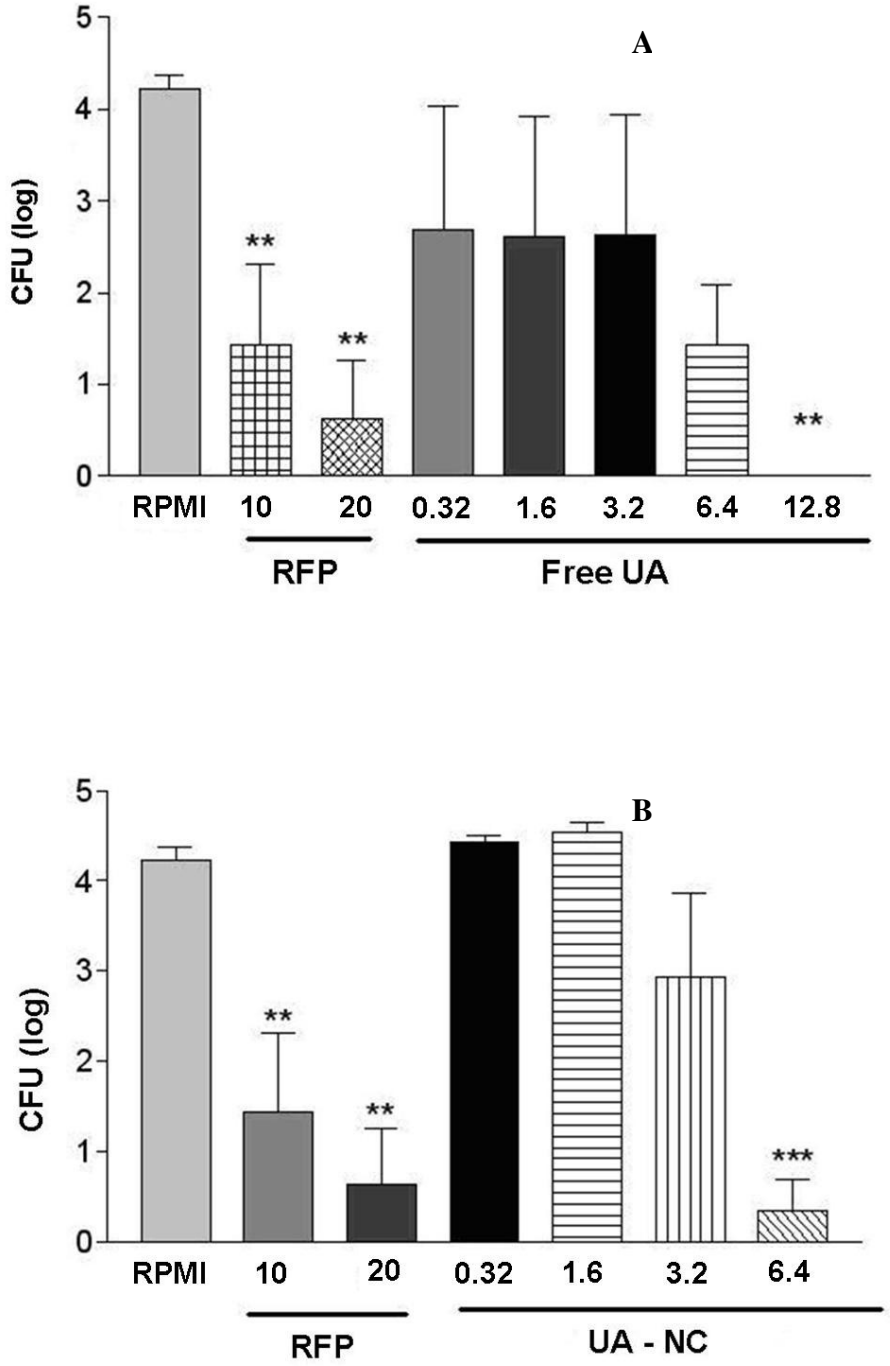


Fig. 6. Intracellular antimycobacterial activity of usnic acid (A) and usnic acid-loaded nanocapsules (B) on macrophages J774 infected with *M. tuberculosis* H37Rv. Macrophages were treated with rifampicin (10 and 20 μg/mL) as a positive control, usnic acid solution (0.32 to 12.8 μg/mL) and usnic acid-loaded nanocapsules (0.32 to 6.4 μg/mL). All samples were diluted in 0.2 % DMSO.

Conclusions

The summarized above results demonstrated that it is possible to encapsulate usnic acid into PLGA nanocapsules. Furthermore, the nanoencapsulation of usnic acid preserved and improved its activity against *M. tuberculosis*. These *in vitro* findings are remarkable and further studies should be carried out to confirm *in vivo* anti-tubercular activity of nanoencapsulated usnic acid.

Acknowledgements

Authors thank the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for partial financial support. A grant of PROCAD-CAPES Program of the Brazilian Education Ministry was appreciated.

References

1. Agrawal, A.K., Gupta, C.M., 2000. Tuftsin-bearing liposomes in treatment of macrophage-based infections. *Adv Drug Deliv Rev* 41, 135–146.
2. Campanella, L., Delfini, M., Ercole, P., Iacoangeli, A., Risuleo, G., 2002. Molecular characterization and action of usnic acid: a drug that inhibits proliferations of mouse polyomavirus *in vitro* and whose main target is RNA transcription. *Biochemistry* 84, 329-334.
3. Chung, G.A.C., Aktar, Z., Jackson, S., Ducan, K., 1995. High-throughput screen detecting antimycobacterial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 39, 2235-2238.
4. Collins, L.A., Franzblau, S.G., 1997. Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrob Agents Chemother* 41, 1004-1009.
5. De Carvalho, E.A.B., Andrade, P.P., Silva, N.H., Pereira, E.C., Figueiredo, R.C.B.Q., 2005. Effect of usnic acid from the lichen *Cladonia substellata* on *Trypanosoma cruzi in vitro:* an ultrastructural study. *Mícron* 36, 155-161.
6. Dietrich, J., Lundberg, C.V., Andersen, P., 2006. TB vaccine strategies—What is needed to solve a complex problem? *Tuberculosis* 86, 163–168.
7. Dutt, M., Khuller, G.K., 2001. Sustained release of isoniazid from a single injectable dose of poly (dl-lactide-co-glycolide) microparticles as a therapeutic approach towards tuberculosis. *Int J Antimicrob Agents* 17, 115–122.

8. Fawaz, F., Bonini, F., Mauglin, J., Lagueny, A.M., 1998. Ciprofloxacin-loaded polyisobutylcyanoacrylate nanoparticles: pharmacokinetics and in vitro antimicrobial activity. *Int J Pharm* 168, 255-259.
9. Feng, S., Huang, G., 2001. Effects of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel (Taxol) from nanospheres of biodegradable polymers. *J Control Rel* 71, 53–69.
10. Ferdous, A. J., Stembridge, N.Y., Singh, M., 1998. Role of monensin PLGA polymer nanoparticles and liposomes as potentiator of ricin A immunotoxins *in vitro*. *J Control Rel* 50, 71–78.
11. Han, D., Matsumaru, K., Rettori, D., Kaplowitz, N., 2004. Usnic acid-induced necrosis of cultured mouse hepatocytes: inhibition of mitochondrial function and oxidative stress. *Biochem Pharmacol* 67, 439-451.
12. Ingolfsdottir, K., Chung, G.A.C., Skulason, V.G., Gissurarson, S.R., Vilhelmsdóttir, M., 1998. Antimycobacterial activity of lichen metabolites *in vitro*. *Eur J Pharm Sci* 6, 141-144.
13. Labana, S., Pandey, R., Sharma, S., Khuller, G.K., 2002. Chemotherapeutic activity against murine tuberculosis of once weekly administered drugs (isoniazid and rifampicin) encapsulated in liposomes. *Int J Antimicrob Agents* 20, 301-304.
14. Makino K., Nakajima T., Shikamura M., Ito F., Ando. S., Kochi, C., Inagawa H., Soma G., Terada, H., 2004. Efficient intracellular delivery of rifampicin to alveolar macrophages using rifampicin-loaded PLGA microspheres: effects of molecular weight and composition of PLGA on release of rifampin. *Colloids Surf B: Biomaterials* 36, 35-42.
15. Müller, K., 2001. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. *Appl Microbiol Biotechnolol* 56, 9-16.
16. Nguyen, L., Thompson, C.J., 2006. Foundation of antibiotic resistance in bacterial physiology: the mycobacterial paradigm. *Trends Microbiol* 14, 304-312.
17. Niveau, G., 2006. Prevention of infectious disease transmission in correctional setting: a review. *Public Health* 120, 33-41.
18. Odabasoglu, F., Cakir, A., Suleyman, H., Aslan, A., Bayir, Y., Halici, M., Kazaz, C., 2006. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *J Ethnopharmacol* 103, 59–65.

19. Oh, Y-K., Nix, D.E., Straubiner, R.M., 1995. Formulation and efficacy of liposome-encapsulated antibiotics for therapy of intracellular *mycobacterium avium* infection. *Antimicrob Agents Chemother* 39, 2104–2111.
20. Pandey R., Khller, G.K. 2004. Chemotherapeutic potential of alginate-chitosan microspheres as anti-tubercular drug carries. *J Antimicrob Chemoth*, 53, 635-640.
21. Reis, C.P., Neufeld, R.J., Ribeiro, A.J., Veiga, F., 2006. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnol, Biol Med* 2, 8– 21.
22. Ribeiro-Costa, R. M., Alves, A.J., Santos, N. P., Nascimento, S.C., Gonçalves, E.C., Silva, N.H., Honda, N.K., Santos-Magalhães, N.S., 2004. *In vitro* and *in vivo* properties of usnic acid encapsulated into PLGA-microspheres. *J Microencapsul* 21, 4, 371-384.
23. Santos, N.P., Nascimento, S.C., Pereira, E.C.G., Silva, N.H., Honda, N.K., Santos-Magalhães, N.S., 2005. Usnic acid-loaded nanocapsules: an evaluation of cytotoxicity. *J Drug Deliv Sci Tech* 15, 355-361.
24. Santos, N.P.S., Nascimento, S.C., Wanderley, M.S.O., Pontes-Filho, N.T., Silva, J.F., Castro, C.M.M.B., Pereira, E.C., Silva, N.H., Honda, N.K., Santos-Magalhães, N.S., 2006. Nanoencapsulation of usnic acid: An attempt to improve antitumour activity andreduce hepatotoxicity. *Eur J Pharm Biopharm* 64, 154-160.
25. Schaffazick, S.R., Guterres, S.S., Freitas, L.L., Pohlmann, A.R., 2003. Physicochemical characterization and stability of the polymeric nanoparticle systems for drug administration. *Quim Nova* 26, 5, 726-737.
26. Sharma, A., Pandey, R., Sharma, S., Khuller, G.K., 2004. Chemotherapeutic efficacy of poly (dl-lactide-co-glycolide) nanoparticle encapsulated antitubercular drugs at sub-therapeutic dose against experimental tuberculosis. *Int J Antimicrob Agents* 24, 599–604.
27. Souza, A.O., Júnior, R.R.S., Melo, P.S., Aldereti, J.B., Conti, R., Haun, M., Sato, D.N., Duran, N., 2001. Antimycobacterial activity of 4'-bromo-[1,1'-biphenyl]-4-yl 4-x-phenylmethanone derivatives and their acute toxicity and cytotoxicity. *Pharmazie* 56, 871-874.
28. Stoll, A., Brack, A., Renz, J., 1950. Die antibakterielle wirkung der usninsaure auf Mykobakterien und andere mikroorganismen. *Experientia* 3, II5-II7.

29. Vartia, K. O. 1950. Antibiotics in lichens II. *Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.,* 28, pP.7-19.

30. Vartia, K.O., 1973. Antibiotics in lichens. In: Ahmadjian, V., Hale, M.E. (Eds.), The Lichens. Academic Press, New York, pp. 547–561.

IV – CONCLUSÕES

IV-CONCLUSÕES

- Foram obtidas nanopartículas esféricas, com superfície lisa e rígida;
- Bandas de absorção específicas do ácido úsnico não foram visualizadas no espectro de absorção na região do infravermelho das UA-NC;
- Os resultados indicam que a encapsulação do ácido úsnico não afetou o perfil térmico das nanopartículas;
- Na nanoencapsulação do ácido úsnico não foi visualizada interação a nível molecular com o material polimérico;
- O ácido úsnico apresentou atividade antimicobacteriana, sendo esta potencializada quando em sua forma nanoencapsulado;
- A encapsulação em nanocápsulas de PLGA 50:50 revelou um aumento de 30% na atividade antimicobacteriana intracelular do UA;
- A encapsulação em nanocápsulas de PLGA foi capaz de manter e potencializar a atividade antimicobacteriana *in vitro* do ácido úsnico.

V - REFERÊNCIAS

V – REFERÊNCIAS

1. ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; STAINMESSE, S.; FESSI, H. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.58, p.1688–1713, 2006.
2. ABO-KHATWA, A. N.; AL-ROBAI, A. A.; AL-JAWHARI, D. A. Lichen acids as uncouplers of oxidative phosphorylation of mouse-liver mitochondria. *Natural Toxins,* v.4, p.96-102, 1996.
3. ajetudes.club.fr/nano/images/nanoca2.jpg, acessado em 21 de dezembro de 2006.
4. AL-BEKAIRI, A. M.; QURESHI, S.; CHAUDHRY, M. A.; KRISHNA, D. R.; SHAH, A. H. Mitodepressive, clastogenic and biochemical effect of (+)-usnic acid in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v.33, p.217-220, 1991.
5. ALI, S. A. M.; ZHONG, S. P.; DOHERTY, P. J.; WILLIAMS, D. F. Mechanisms of polymer degradation in implantable devices: I. Poly(caprolactone). *Biomaterials*, v.14, p.648, 1993.
6. ARANGOA, M. A.; PONCHEL, G.; ORECCHIONI, A. M.; RENEDO, M. J.; DUCHÊNE, D.; IRACHE, J. M. Bioadhesive potential of gliadin nanoparticulate systems. E*uropean Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.11, p.333-341, 2000.
7. ARCUS, V.L.; LOTT, S.; JOHNSTON, J.M.; BAKER, E. N. The potential impact of structural genomics on tuberculosis drug discovery. *Reviews-gene to Screen*, v.11, n.1/2, p.28-34, 2006.
8. ASAHINA & SHIBATA. Chemistry of Lichen substances. *Japan Society for Promotion of Science*, p.240, 1954.
9. BASSANI, L.; MULLER, K.; POHLMANN, C. R.; GUTERRES, A.; TAVARES D. C. Spray-drying colloidal suspensions of polymer nanocapsules or nanospheres, e.g. containing drug such as diclofenac, including addition of silicon dioxide before drying to improve suspension stability, 2001.
10. BOSHOFF, H.I. & BARRY, C.E. Is the mycobacterial cell wall a hopeless drug target for latent tuberculosis? *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, v.3, n.2, p.237-345, 2006.
11. BUSTINZA, F. Antibacterial substances from lichens. *Endeavour*, p. 95-99, 1951.
12. CAMPANELLA, L.; DELFINI, M.; ERCOLE, P.; IACOANGELI, A.; RISULEO, G. Molecular characterization and action of usnic acid: a drug that inhibits proliferations of

mouse polyomavirus *in vitro* and whose main target is RNA transcription. *Biochemistry*, v.84, p.329-334, 2002.

13. CARDARELLI, M.; SERINO, G.; CAMPANELLA. E. P.; NARDONE, F. C.; ALESIANE, O.; ROSSIELLO, F. Antimitotic effects of usnic acid on different biological systems. *Cellular Molecular Life Science,* v.53, p.667-672, 1997.

14. COUVREUR, P.; BARRATT, G.; FATTAL, E. ; LEGRAND, P. ; VAUTHIER, C. Nanocapsule technology: a review. *Critical Review in Therapeutic Drug Carrier Systems*, v.19, n.2, p.99-134, 2002.

15. DE CARVALHO, E. A. B.; ANDRADE, P. P.; SILVA, N. H.; PEREIRA, E. C.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q. Effect of usnic acid from the lichen *Cladonia substellata* on *Trypanosoma cruz*i *in vitro*: an ultrastructural study. *Mícron*, v.36, p.155-161, 2005.

16. DERETIC, V.; FRATTI, R.A. *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. *Molecular Microbiology*, v.31, n.6, p.1603-1609, 1999.

17. DESHPANDE, A. A.; HELLER, J.; GURNY, R. Bioerodible polymers for ocular delivery. *Critical Review Therapy Drug Carries Systems*, v.15, p.381– 420, 1998.

18. DROMBRET, M. C. Tuberculose pulmonaire de l'adulte. *EMC-médecine*, v.1, p.406-416, 2004.

19. EDDINE, A. N.; BAUMANN, S.; KAUFMANN, S. H. E. New tuberculosis vaccines approaching clinical trial – An overview. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*, v.3, n.2, p. 113-119, 2006.

20. ELKE, M.; ROLF-JOACHIM, M.; WOLF-DIETER, D. Interrelation between side chain crystallization and dynamic glass transitions in higher poly(n-alkyl methacrylates). *Thermochimica acta*, v.403, n.1, p.105-114.

21. EMERICH, D. F. & THANOS, C.G. The pinpoint promise of nanoparticle-based drug delivery and molecular diagnosis. *Biomolecular Engineering, v.*23, p.171-184, 2006.

22. FAROKHZAD, O. C. & LANGER, R. Nanomedicine: Developing smarter therapeutic and diagnostic modalities. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.58, p.1456-1459, 2006.

23. FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement, *International Journal of Pharmaceutics*, v.55, p.R1-R4,1989.

24. FORSSEN, E.; WILLIS, M. Ligand-targeted liposomes, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.29, p.249–271, 1998.

25. FOURNET, A.; FERREIRA, M. E.; ARIAS, R. A.; ORTIZ, T. S.; INCHAUSTI, A.; YALUFF, G.; QUILHOT, W.; FERNANDEZ, E.; HIDALGO, M. E. Activity of compounds isolated from chilean lichens against experimental cutaneous leishmaniasis. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v.116, n.1, p.51-54, 1997.

26. GIRARD, M. P.; FRUTH, U.; KIENY, M. P. A review of vaccine research and development: Tuberculosis. *Vaccine review*, v.23, p.5725–5731, 2005.

27. GLOBAL ALLIANCE FOR TB DRUG DISCOVERY. Annual Report 03/04: in www.tballiance.org, (acessado em 09 de dezembro de 2006), 2003.

28. GOMES, C.; ROVARIS, D. B.; SEVERINO, J. L.; GRUNER, M. F. Perfil de resistência de "*M. tuberculosis*" isolados de pacientes portadores do HIV/AIDS atendidos em um hospital de referência. *Jornal de Pneumologia*, v.26, n.1, p. 25-29, 2000.

29. GOMEZ, J. E. & MCKINNEY, J. D. *M. tuberculosis* persistence, latency, and drug tolerance. *Tuberculosis,* v.84, p.29-44, 2004.

30. GRASSO L.; GHIRARDI, P. E.; GHIONE, M. Usnic acid, a selective antimicrobial agent against *Streptococcus mutans*: a pilot clinical study. *Current Therapeutic Research*, v.46, n.6, p.1067-1070, 1989.

31. GROUPE DE TRAVAIL DU CONSEIL SUPÉRIEUR D'HYGIÈNE PUBLIQUE DE FRANCE. Epidemiology of tuberculosis. *Médecine et Maladies Infectieuses, v*.34, p.344–349, 2004.

32. HALE, M. E. *The Biology of Lichens*. 3ªed. London, 90p, 1983.

33. HAN, D.; MATSUMARU, K.; RETTORI, D.; KAPLOWITZ, N. Usnic acid-induced necrosis of cultured mouse hepatocytes: inhibition of mitochondrial function and oxidative stress. *Biochemical Pharmacology,* v.67, p.439-451, 2004.

34. HAYDEL, S. E. & CLARK-CURTISS, J. E. Global expression analysis of two-component system regulator genes during *Mycobacterium tuberculosis* growth in human macrophages. *FEMS Microbiology Letters*, v.236, p.341–347, 2004.

35. http://www.datasus.gov.br. Acessado em: 15 de novembro de 2006.

36. http://www.magazine.wustl.edu/nanoparticles, acessado em 29 de novembro de 2006.

37. INDEX MERCK

38. INDEX MERCK. Encyclopedia of chemical, drugs and biologicals, New Jersey: Merck 12 ed., p.1557 (9806), 1995.

39. INGÓLFSDÓTTIR, K. Usnic acid. *Phytochemistry,* v.61, p.729-736, 2002.

40. INGÓLFSDÓTTIR. K.; CHUNG, G. A. C.; SKÚLASON, V. G.; GISSURARSON, S. R.; VILHELMSDÓTTIR, M. Antimycobacterial activity of lichen metabolites *in vitro. European Journal of Pharmaceutical Sciences,* v.6, p.141-144, 1998.

41. JAIN, R. A. The manufacture techniques of various drug loaded biodegradable poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials*, v.21, p.2475-2490, 2000.

42. JIANGA, W.; GUPTAB, R. K.; DESHPANDEC, M. C.; SCHWENDEMANC, S. P. Biodegradable poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles for injectable delivery of vaccine antigens. *Advanced Drug Delivery Reviews, v.*57, p.391– 410, 2005.

43. JOHNSON, R. B.; FELDOT, G.; LARDY, H. A. The mode of action of the antibiotic usnic acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics,* v.28, p.317-323, 1950.

44. KONEMAN, E. W. Diagnóstico Microbiológico Texto e Atlas Colorido. 5ª edição p.903-964, 2001.

45. KOO, O. M.; RUBINSTEIN, I.; ONYUKSEL, H. Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine,* v.1, p.193– 212, 2005.

46. KRISTMUNDSDÓTTIR, T.; ARADÓTTIR, H. A.; INGÓLFSDÓTTIR, K.; ÖGMUNDSDÓTTIR, H. M. Solubilization of lichen metabolite (+)-usnic acid for testing in tissue culture. *Journal of Pharmacy and Pharmacology,* v.54, p.1447-1452, 2002.

47. KRISTMUNDSDÓTTIR, T.; JÓNSDÓTTIR, E.; ÖGMUNDSDÓTTIR, H. M. Solubization of poorly soluble lichen metabolites for biological testing on cell lines. *European Journal of Pharmaceutical Sciences,* v.24, p.539-543, 2005.

48. KUMAR, S. & MÜLLER, K. Lichen metabolites 2: antiproliferative and cytotoxic activity of gyrophoric, usnic and diffractaic acid on human keratinocyte growth. *Journal of Natural Products,* v.62, p.821-823, 1999.

49. LAUTERWEIN, M.; OETHINGER, M.; BELSNER, K.; PETER, T.; MARRE, R. *In vivo* activities of the lichen secondary metabolites vulpinic acid, (+) usnic acid, and (-) usnic

acid against aerobic and anaerobic microorganisms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy,* p. 2541-2543, 1995.

50. LIMAYEM, I.; CHARCOSSET, C.; FESSI, H. Purification of nanoparticle suspensions by a concentration/diafiltration process. *Separation and Purification Technology*, v.38, p.1-9, 2004.

51. LUMBSCH, H. T. A new species in the *Lecanora bubfusca* group containing usnic acid in addition to atranorin. *Lichenologist*, v.27, n.3, p.161-167, 1995.

52. MAGENHEIM, B. & BENITA, S. Nanoparticles characterization: a comprehensive phytochemical appoach, S.*T.P. Pharma*, v.1, p.221-241, 1991.

53. MARCANO, V.; RODRIGUEZ-ALCOCER, V.; MORALES, M. Occurrence of usnic acid in *Usnea laevis Nylander* (lichenized ascomycetes) from the Venezuelan Andes. *Journal of Ethnopharmacology*, v.66, p.343-346, 1999.

54. MAYER, M.; O'NEILL, M. A.; MURRAY, K. E.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S.; CARNEIRO-LEÃO, A. M. A.; THOMPSON, A. M. Appleyard, Usnic acid increases p53 protein expression in MCF7 cancer cells without increasing p53 transcriptional activity impress. *Anticancer Drugs*, v.16, n.8, p.805-809, 2005.

55. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de bolso: Doenças infecciosas e parasitárias. 3ª edição. Secretaria de Vigilância em Saúde, v.II, 2004.

56. MÜLLER, K. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. *Applied Microbiology and Biotechnology,* v.56, p.9-16, 2001.

57. NASH, T. H. *Lichen Biology*. Cambridge University. Press, 1ª ed., p.303, 1996.

58. NEFF, G. W.; REDDY, K. R.; DURAZO, F. A.; MEYER, D.; MARRERO, R.; KAPLOWITZ, N. Letter to editor. *Journal of Hepatology,* v.41, n.6, p.1062-1064, 2004.

59. NELSON, D. L. & COX, M. M. Lehninger: Principles of biochemistry. 3ª edição, In: Biological membranes and transport, p.389-436, 2000.

60. NGUYEN, L. & THOMPSON, C. J. Foundations of antibiotic resistance in bacterial physiology: the mycobacterial paradigm. *TRENDS in Microbiology*, v.14, n.7, p.304-312, 2006.

61. NISHIOKA, Y.; YOSHINO, H. Lymphatic targeting with nanoparticulate system. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.47, p.55–64, 2001.

62. ODABASOGLU, F.; CAKIR, A.; SULEYMAN, H.; ASLAN, A.; BAYIR, Y.; HALICI, M.; KAZAZ, C. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *Journal of Ethnopharmacology,* v.103, p.59–65, 2006.

63. PAULI, G. F.; CASE, R. J.; INUI, T.; WANG, Y.; CHO, S.; FISCHER, N. H.; FRANZBLAU, S. G. New perspectives in natural products in TB drug research. *Life Sciences*, v.78, p.485-494, 2005.

64. PHILLIPS, M.; CATANEOA, R. N.; CONDOSC, R.; ERICKSOND, G. A. R.; GREENBERGA, J.; LA BOMBARDIE, V.; MUNAWARA, M. I.; TIETJE, O. Volatile biomarkers of pulmonary tuberculosis in the breath. *Tuberculosis*, v.87, n.1, p.44-52, 2007.

65. PISON, U.; WELTE, T.; GIERSIG, T.; GRONEBERG, D. A. Nanomedicine for respiratory diseases. *European Journal of Pharmacology, v.*533, p.341-350, 2006.

66. POHLMANN, A. R.; WEISS, V.; MERTINS, O.; SILVEIRA, N. P.; GUTERRES, S. S., Spray-dried indomethacin-loaded polyester nonacapsules and nanospheres: development, stability evaluation and nanostructure models, *European Journal of Pharmaceutics Sciences*, v.16 p.305-312, 2002.

67. PRAMYOTHIN, P.; JANTHASOOT, W.; PONGNIMITPRASERT, N.; PHRUKUDOMC, S.; RUANGRUNGSI, N. Hepatotoxic effect of (+)usnic acid from *Usnea siamensis* Wainio in rats, isolated rat hepatocytes and isolated rat liver mitochondria. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 90, p.381-387, 2004.

68. PROSKA, B.; STURDIKOVA, M.; PRONAYOVA, N. A.; LIPTAJ, T. (-)-Usnic acid and its derivatives. Their inhibition of fungal growth and enzyme activity. *Phamazie,* v.51, n.3, p.195-196, 1996.

69. RATTAN, A.; KALIA, A.; AHMAD, N. Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Molecular Perspectives. *Emerging Infectious Diseases*, v.4, n.2, p.1-15, 1998.

70. REIS, C. P.; NEUFELD, R. J.; RIBEIRO, A. J.; VEIGA, F. Nanoencapsulation I: Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, v.2, p.8-21, 2006.

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

72. RODRIGUES, J. M. R. LIMA, K. M.; CASTELO, A. A. M. C.; MARTINS, V. L. D. B.; SANTOS, S. A.; FACCIOLLI, L. H.; SILVA, C. L. É possível uma vacina gênica auxiliar no controle da tuberculose? *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v.30, n.4, p.468-477, 2004.

73. SANTOS, N. P. *Nanocápsulas de PLGA contendo ácido úsnico de Cladonia substellata (VAINIO) com potencial ação antitumoral.* Recife, 140p. Tese (Doutorado) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 2003.

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

75. SANTOS, N. P.; NASCIMENTO, S. C.; WANDERLEY, M. S. O.; PONTES-FILHO, N. T.; SILVA, J. F.; CASTRO, C. M. M. B.; PEREIRA, E. C.; SILVA, N. H.; HONDA, N. K.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Nanoencapsulation of usnic acid: An attempt to improve antitumour activity and reduce hepatotoxicity. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,* v.64, n.2, p.154-160, 2006.

76. SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; PONTES, A.; PEREIRA, V. M. W; CAETANO, M. N. P.; Colloidal carries for benzantine penicillin G: nanoemulsions na nanocapsules. *International Journal of Pharmaceutics,* v.208, p.71-80, 2000.

77. SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R.; Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química nova,* v. 26, n.5, p.726-737, 2003.

78. SCHUGENS, C. H.; GRANDFILS, C.; JEROME, R.; TEYSSIE, P. H.; DELREE, P.; MARTIN, D.; MALGRANGE, B.; MOONEN, G. Preparation of a macroporous biodegradable polylactide implant for neuronal transplantation. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.29, n.11, p.1349, 1995.

79. SCIRPA, P.; SCAMBIA, G.; MASCIULLO, V.; BATTAGLIA, F.; FOTI, E.; LOPEZ, R.; VILLA, P.; MALECOE, M.; MANCUSO, S. Terapia adiuvante com um preparato a base di zinco solfato e acido úsnico delle lesioni genitali da Human Papilloma Vírus (HPV) dopo trattamento chirurgico distruttivo. *Minerva Ginecology,* v.51, n.6, p.255-260, 1999.

80. SHIBATA, S. Great discoberies in bryology and lichenology. *The bryologist*, v.103, n.4, p.710-719, 2000.

81. SILVA, C. L.; BONATO, V. L. D.; LIMA, K. M.; COELHO-CASTELO, A. A.M.; FACCIOLI, L., SARTORI, A.; SOUZA, A. O.; LEA, S. C. Cytotoxic T cells and mycobacteria. *FEMS Microbiology Letters*, v.197, p.11-18, 2001.

82. SOARES, A.Q.; OLIVEIRA, L. F.; RABELO, D.; SOUZA, A. R. Polímeros biodegradáveis: novas perspectivas para as ciências farmacêuticas. *Revista Eletrônica de Farmácia,* v.2, n.2, p.202-205, 2005.

83. SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*, v.70, p.1-20, 2001.

84. SOUZA, M. V. N.; VASCONCELOS, T. R. A. Fármacos no combate à tuberculose: passado, presente e futuro. *Química nova*, v.28, n.4, p.678-682, 2005.

85. TAKAI, M.; UEHARA, Y.; BEISLER, J. A. Usnic acid as potential antineoplasic agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.22, n.11, p.1380-1384, 1979.

86. TORCHILIN, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carrier. *Nature Review Drug Discovery*, v.4, p.145-160, 2005.

87. VARTIA, K. O. Antibiotics in lichens II. *Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.,* v. 28, p.7-19, 1950.

88. VARTIA, K. O. Antibiotics in lichens. In: Ahmadjian, V., Hale, M.E. (Eds.), The Lichens. Academic Press, New York, p. 547–561, 1973.

89. VAUTHIER, C.; DUBERNET, C.; FATTAL, E.; PINTO-ALPHANDARY, H.; COUVREUR P. Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.55, p.519-548, 2003.

90. VAVASSEUR, A.; GAUTIER, H. THIBAUD, M. C.; LASCÈVE, G. Effect of usnic acid on the oxygen exchange properties of mesophyll cell protoplast from Commelina communis L. *Journal Plant Physiological,* v.139, p.90-94, 1991.

91. WHO (World Health Organization), acessado em outubro de 2006.

92. WU, J.; ZHANG, M.; DING, D.; YAN, B. Effect of *Cladonia alpestris* on *Trychomonas vaginalis in vitro*, v.13, p.126-129, 1995.

93. YAMAMOTO, Y.; MIURA, Y.; KINOSHITA, Y.; HIGUCHI, M.; YAMADA, Y.; MURAKAMI, A.; OHIGASHI, H.; KOSHIMIZU, K. Screenig of tissues cultures and thalli of lichens and some their active constituents for inhibition of tumor promoter-induced Epstein-Barr virus activation. *Chemical Pharmaceuticals Bulletin,* v.43, n.8, p. 1388-1390, 1995.

94. ZHOU, S.; LIAO, X.; LI, X.; DENG, X.; LI, H. Poly-DL-lactide-co-poly (ethylene glycol) microspheres as potential vaccine delivery systems. *Journal of Controlled Release*, v.8, n.2-3, p.195-205, 2002.

95. ZHUANG, F.F.; LIANG, R.; ZOU, C. T.; MA, H.; ZHENG, C. X.; DUAN, M. X. High efficient encapsulation of plasmid DNA in PLGA microparticles by organic phase self-emulsification. *Journal of Biochemical and Biophys Methods*, v.52, p.169-178, 2002.

VI – ANEXO I

VII – ANEXO II

RESUMOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

1. MOURA, Marigilson Pontes de Siqueira; WANDERLEY, Marcela Silvestre Outtes; LIRA, Mariane Cajubá Brito; SANTOS, Noemia Pereira; GALETTI, Fábio Cícero de Sá; SILVA, Célio Lopes; SIMIONI, Andreza; TEDESCO, Ntônio Cláudio; MAGALHÃES, Nereide Stela Santos. AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA E INTERAÇÃO COM MACRÓFAGOS J744 DE LIPOSSOMAS E NANOCÁPSULAS CONTENDO ÁCIDO ÚSNICO. In: II Congresso Norte-Nordeste de Multirresistência Bacteriana, 2006, Recife-PE.

2. MOURA, Marigilson Pontes de Siqueira; LIRA, Mariane Cajubá Brito; WANDERLEY, Marcela Silvestre Outtes; MAGALHÃES, Nereide Stela Santos. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO ESPECTROFOTOMÉTRICO UV PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ÚSNICO EM LIPOSSOMAS. In: II Congresso Norte-Nordeste de Multirresistência Bacteriana, 2006, Recife-PE.

3. WANDERLEY, Marcela Silvestre Outtes; MAGALHAES, Nereide Stela Santos; FERRAZ, Milena Sales; NASCIMENTO, Silene Carneiro; SANTOS, Noemia Pereira da Silva; COSTA, Teresa Dalla. DETERMINATION OF USNIC ACID IN RAT PLASM BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY. In: XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBQ, 2006, Águas Lindóia-SP.

4. WANDERLEY, Marcela Silvestre Outtes; SILVA, Célio Lopes; PEREIRA, Eugênia Cristina Gonçalves; GALETTI, Fábio Cícero de Sá; MAGALHAES, Nereide Stela Santos; SILVA, Nicácio Henrique; SANTOS, Noemia Pereira da Silva; MOURA, Marigilson Pontes de Siqueira; TEDESCO, Antônio Cláudio; SIMIONI, Andreza; SILVA, Dáfila Gabriela Varjão Correia da. *IN VITRO* ACTIVITY AGAINST *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* AND CELLULAR UPTAKE OF USNIC ACID-LOADED NANOCAPSULES. In: XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBQ, 2006, Águas de Lindóia-SP.

5. SIMONETTI, Ana Catarina; FERRAZ, Milena Sales; SANTOS, Noemia Pereira da Silva; WANDERLEY, Marcela Silvestre Outtes; PEREIRA, Eugênia Cristina Gonçalves; SILVA, Nicácio Henrique; EGITO, E Socrates Tabosa; PONTES FILHO, Nicodemos Teles; MAGALHÃES, Nereide Stela Santos. TOXICIDADE DE NANOCÁPSULAS CONTENDO ÁCIDO FUMARPROTOCETRÁRICO COM O SISTEMA DE

MICROEMULSÃO ÓLEO/ÁGUA. In: II Congresso Norte-Nordeste de multirresistência Bacteriana, 2006, Recife-PE.

6. WANDERLEY, Marcela Silvestre Outtes; SIMONETTI, Ana Catarina; PEREIRA, Eugenia; FERRAZ,Milena Sales; SILVA, Nicácio Henrique; PONTES FILHO, Nicodemos Teles; PEREIRA, Noemia Santos; MAGALHÃES, Nereide Stela Santos; EGITO, E Socrates Tabosa. TOXICITY OF FUMARPROTOCETRARIC ACID LOADED-NANOCAPSULES PREPARED WITH OIL-IN-WATER MICROEMULSION. In: XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2005, Águas de Lindóia - SP.

7. WANDERLEY, Marcela Silvestre Outtes; FERRAZ, Milena Sales; SIMONETTI, Ana Catarina; PONTES FILHO, Nicodemos Teles; EGITO, E Socrates Tabosa Do; PEREIRA, Eugênia Cristina Gonçalves; MAGALHAES, Nereide Stela Santos; SILVA, Nicácio Henrique da; SANTOS, Noemia Pereira da Silva. TOXICITY OF FUMARPROTROCETRARIC ACID LOADED-NANOCAPSULES PREPARED WITH OIL-IN-WATER MICROEMULSION. In: I Jornada Científica do Lika, 2005, Recife-PE.