



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

DANIEL CHARLES DOS SANTOS MACÊDO

**AVALIAÇÃO DE LIPOSSOMAS SÍTIO-ESPECÍFICOS CONTENDO ÁCIDO
ÚSNICO FRENTE A MACRÓFAGOS INFECTADOS COM *Mycobacterium
tuberculosis***

Recife
2020

DANIEL CHARLES DOS SANTOS MACÊDO

**AVALIAÇÃO DE LIPOSSOMAS SÍTIO-ESPECÍFICOS CONTENDO ÁCIDO
ÚSNICO FRENTE A MACRÓFAGOS INFECTADOS COM *Mycobacterium*
*tuberculosis***

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

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos

Orientadora: Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães

Coorientadora: Profa. Dra. Mariane Cajubá de Britto Lira Nogueira

Recife
2020

M141a	Macêdo, Daniel Charles dos Santos. Avaliação de lipossomas sítio-específicos contendo ácido úsnico frente a macrófagos infectados com <i>Mycobacterium tuberculosis</i> / Daniel Charles dos Santos Macêdo. – 2020. 84 f.: il.; tab.; 30 cm. Orientadora: Nereide Stela Santos Magalhães. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2020. Inclui referências e apêndices. 1. Tuberculose. 2. Lipossomas. 3. Polissacarídeos. 4. Ácido úsnico. 5. Fucana. I. Magalhães, Nereide Stela Santos (Orientadora). II. Título.	615.3 CDD (20.ed.) UFPE (CCS2020-109)
-------	--	---

DANIEL CHARLES DOS SANTOS MACÊDO

**AVALIAÇÃO DE LIPOSSOMAS SÍTIO-ESPECÍFICOS CONTENDO ÁCIDO
ÚSNICO FRENTE A MACRÓFAGOS INFECTADOS COM *Mycobacterium*
*tuberculosis***

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

Aprovado em: 05 / 03 / 2020

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Noemia Pereira da Silva (Titular)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Isabella Macário Ferro Cavalcanti (Titular)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Beate Seagesser (Examinadora interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Francisco Humberto Xavier Júnior (Examinador externo)
Universidade Potiguar - UNP

Dedico este trabalho à minha amada mãe, o doce motivo de cada sacrifício, esforço e dedicação na luta pelo crescimento profissional.

AGRADECIMENTOS

Palavras faltar-me-iam, mas agradeço ao meu bom Deus por Sua constante presença e amizade durante essa árdua, esperançosa e linda trajetória.

Agradeço à minha mãe Verônica Maria, por ensinar-me o caminho da verdade, por amar-me tão profundamente, e por sempre incluir-me em suas orações. Mãe, amo-te eternamente.

Agradeço à minha vó Severina Maria, por não desistir de mim, investindo todas as suas forças na realização deste sonho tão almejado. Vó, a senhora é um exemplo.

Agradeço ao meu tio Carlos Alberto e sua esposa Marli Lopes, por estarem tão presentes, mesmo tão distantes; a minha tia Graça, minhas primas Polyanna e Tatyanna, por abrigar-me em seus corações de uma forma tão especial. Saibam que vocês são pedras preciosas para mim.

Agradeço à minha linda namorada, Jemima Hadassa, por sua doce companhia em meio às noites escuras; por cada palavra, cada abraço, cada gesto de atenção, cada momento dedicado à minha pessoa. Amor meu, amo-te ardentemente.

Agradeço ao Prof. Rodolfo de Farias bem como à Dra. Sidicleia na realização da síntese química, os quais foram peças importantíssimas na realização deste trabalho.

Agradeço à minha coorientadora Profa. Dra. Mariane por todo companheirismo, atenção e cuidado no decorrer destes dois anos, sendo este exemplo de dedicação para todos nós. Professora, muito obrigado por tudo.

Agradeço à minha orientadora Profa. Nereide Magalhães por abrir as portas do LIKA e permitir o desenvolvimento desta dissertação e ser este exemplo de competência e profissionalismo.

Agradeço aos amigos e companheiros do setor de bioquímica do LIKA, Sandreli, Iago e Cássia, pelos sábios conselhos e presença marcante em minha construção profissional. Gostaria de agradecer também à aluna Luana Bastos, pelo forte apoio e dedicação na execução das atividades. Muito obrigado, meus amigos.

Agradeço à Dra. Rafaela Ferraz, M.^a Aline e à biomédica Luana pelo importantíssimo apoio na condução dos experimentos.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico –CNPq pelo auxílio financeiro, culminando na concretização deste trabalho.

Agradeço a todos que de alguma forma, direta ou indireta, contribuíram com a realização deste sonho.

Tua é, Senhor, a grandeza, o poder, a honra, a vitória e a majestade, pois teu é tudo o que há nos céus e na terra. Teu é, Senhor, o reino e tu estás acima de todos. A BÍBLIA, 2010 (p. 392).

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar a atividade do ácido úsnico (AU) encapsulado em lipossomas revestidos com fucana (AU-Lipo_{Fuc}) em macrófagos J774 infectados com *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). A fucana (Fuc) foi extraída a partir da *F. vesiculosus*, e posteriormente realizada sua conjugação ao colesterol e caracterizada através da espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), calorimetria de varredura diferencial (DSC) e por espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDX). Os lipossomas sem fucana (Lipo), contendo 5 mg de Fuc-hidrofobizada (Lipo-Fuc₅) e 10 mg de Fuc-hidrofobizada (Lipo-Fuc₁₀) encapsulando AU (80 mM) foram preparados pelo método de hidratação do filme lipídico e caracterizados através de tamanho médio das vesículas (TP), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (ζ) e eficiência de encapsulação do AU nos lipossomas (EE%). A captura dos lipossomas pelos macrófagos foi avaliada a partir do cultivo das células em placas de 24 poços, onde as formulações foram adicionados e a placa incubada por 1h e 3h. Para avaliar a endocitose, inibidores das vias foram utilizados antes da adição das formulações, sendo posteriormente incubadas por 1h. A ação antimicobacteriana de AU-LipoFuc₅ foi avaliada utilizando macrófagos infectados com o Mtb (H37Ra) onde, após 3 horas de infecção, as células foram tratadas com AU e fármacos padrões durante 24 h. Após o tratamento, as células foram lisadas, a bactéria extraída, e plaqueadas. Após crescimento das UFC, estas foram contadas e o resultado expresso: + (0 a 5 UFC); ++ (6 a 10 UFC); +++ (11 a 15 UFC); ++++ (16 a 20 UFC) e +++++ (> 20 UFC). O FTIR revelou absorção da Fuc, Fuc-Hidrof, e do radical de colesterol conforme a literatura. Para o DSC, a fucana livre e a fucana hidrofobizada apresentaram 3 estágios (desidratação, pirólise e desvolatilização). O EDX confirmou a presença de enxofre na Fuc (20,94%) e na Fuc-Hidrof (22,18%). Lipo-Fuc₅ e Lipo-Fuc₁₀ apresentaram aumento de tamanho significativo de $241,2 \pm 41,08$ nm para $2050,3 \pm 9,1$ nm, respectivamente, quando comparadas aos lipossomas sem revestimento (Lipo = $104,8 \pm 0,9$ nm). O aumento no tamanho das vesículas também foi observado em lipossomas contendo AU (AU-Lipo-Fuc₅= $1441,6 \pm 3$ nm; LipoFuc₁₀= $2243,6 \pm 5$ nm), os quais apresentaram EE% em torno de 97%. Todas as formulações apresentaram PDI abaixo de 1, e houve uma diminuição do ζ com o aumento da concentração da Fuc, sugerindo sua presença na superfície dos lipossomas. Fluorescência foi

observada em macrófagos incubados com Lipo-Fuc₅ e Lipo-Fuc₁₀ nos tempos de 1 h e 3 h, e apenas em 3 h para macrófagos incubados com Lipo. Lipo foi capturado via clatrina e Lipo-Fuc₁₀ pelas vias clatrina e macropinocitose. Lipo-Fuc₅ não foi internalizado por nenhuma via analisada neste trabalho. AU encapsulado em lipossomas revestidos com fucana (3,42 µg/ml) apresentaram atividade antimicobacteriana similar à RMP (0 a 5 UFC) e superior àquela do EMB (16 a 20 UFC), mesmo em concentração 4,7 vezes menor em relação ao EMB. A formulação lipossomal revestida com fucana Lipo-Fuc₅ permite, portanto, explorar o potencial anti-TB do ácido úsnico.

Palavras-chave: Tuberculose. Lipossomas. Polissacarídeos. Ácido úsnico. Fucana.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the activity of usnic acid (AU) encapsulated in liposomes coated with fucoidan (AU-Lipo-Fuc) on macrophages (J774) infected with *M. tuberculosis* (Mtb). The fucoidan (Fuc) was extracted from *F. vesiculosus*, and subsequently conjugated to cholesterol and characterized by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Differential Scanning Calorimetry (DSC) and by energy dispersive X-ray spectrometry (EDX). Liposomes without fucoidan (Lipo), containing 5 mg of Fuc-hydrophobized (Lipo-Fuc₅) and 10 mg of Fuc-hydrophobized (Lipo-Fuc₁₀) encapsulating AU (80 mM) were prepared by the lipid film hydration method and characterized through particle size (PS), polydispersion index (PDI), zeta potential (ζ) and AU encapsulation efficiency in liposomes (EE%). The capture of liposomes by macrophages was evaluated by culturing the cells in 24-well plates, where the formulations were added, and the plate incubated for 1h and 3h. To assess endocytosis, inhibitors of the pathways were used prior to the addition of the formulations and were subsequently incubated for 1h. The antimycobacterial action of AU-Lipo-Fuc₅ was evaluated using macrophages infected with Mtb (H37Ra) where, after 3 hours of infection, the cells were treated with AU and standard drugs for 24 h. After treatment, the cells were lysed, the bacteria extracted, and plated. After UFC growth, these were counted and the result expressed: + (0 to 5 UFC); ++ (6 to 10 UFC); +++ (11 to 15 UFC); ++++ (16 to 20 UFC) and +++++ (> 20 UFC). FTIR revealed absorption of Fuc, Fuc-Hidrof, and the cholesterol radical according to the literature. For the DSC, the free fucana and the hydrophobized fucana presented 3 stages (dehydration, pyrolysis and devolatilization). EDX confirmed the presence of sulfur in Fuc (20.94%) and Fuc-Hidrof (22.18%). Lipo-Fuc₅ and Lipo-Fuc₁₀ showed a significant increase in size from 241.2 ± 41.08 nm to 2050.3 ± 9.1 nm, respectively, when compared to uncoated liposomes (Lipo = 104.8 ± 0.9 nm). The increase in the size of the vesicles was also observed in liposomes containing AU (AU-Lipo-Fuc₅ = 1441.6 ± 3 nm; AU-Lipo-Fuc₁₀ = 2243.6 ± 5 nm), which presented EE% around 97%. All formulations showed PDI below 1, and there was a decrease in ζ with increasing Fuc concentration, suggesting its presence on the surface of liposomes. Fluorescence was observed in macrophages incubated with Lipo-Fuc₅ and Lipo-Fuc₁₀ at 1 h and 3 h, and only in 3 h for macrophages incubated with Lipo. Lipo was captured via clathrin and Lipo-Fuc₁₀ via clathrin and macropinocytosis. Lipo-Fuc₅ was

not internalized in any way analyzed by this study. AU encapsulated in fucan-coated liposomes (3.42 μg / ml) showed antimycobacterial activity similar to that of RMP (0 to 5 CFU) and higher than that of EMB (16 to 20 CFU), even at a concentration 4.7 times lower than that of EMB. The liposomal formulation coated with fucana Lipo-Fuc₅ therefore allows to explore the anti-TB potential of usnic acid.

Keywords: Tuberculosis. Liposomes. Polysaccharides. Usnic acid. Fucoidan.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Incidência (A) e coeficiente de mortalidade (B) da tuberculose por Unidade Federativa. Dados até fevereiro de 2017.	21
Figura 2 –	Evolução das lesões granulomatosas. Decorridos 20-30 dias da infecção, as lesões granulomatosas se desenvolvem e começam a evidenciar uma necrose na região central (A). Com o passar do tempo, o local afetado demonstra reparo tecidual, o qual apresenta tecido fibroso com posterior calcificação (B). Após 60-100 dias, as lesões necróticas são completamente substituídas por tecido de calcificação, denominado tubérculo (C).	22
Figura 3 –	Estrutura química do ácido úsnico.	28
Figura 4 –	Classificação da endocitose encontrada em todas as células animais, tendo como base as proteínas responsáveis pela internalização de partículas e solutos.	36
Figura 5 –	Estrutura química da fucana (a) e do monossacarídeo fucose (b).	39
Figura 6 –	FTIR do colesterol e do radical de colesterol (colesteroil). Pico do grupamento NC=O evidenciado em 2256 cm^{-1} .	50
Figura 7 –	FTIR da fucana e da fucana hidrofobizada (colesteroil-fucana).	50
Figura 8 –	Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDX). Espectro da fucana livre (a) e da fucana hidrofobizada (b).	51

Figura 9 –	DSC da Fuc e Fuc Hidrofobizada.	52
Figura 10 –	Lipossomas contendo ou não ácido úsnico revestidos ou não com fucana: a: Lipo; b: AU-Lipo; c: Lipo-Fuc ₅ ; d: Lipo-Fuc ₁₀ ; e: AU-Lipo-Fuc ₅ ; AU-Lipo-Fuc ₁₀).	53
Figura 11 –	Lipossomas não revestidos e revestidos com fucana contendo rodamina B.	55
Figura 12 –	Visualização microscópica de internalização celular dos lipossomas em macrófagos J774. Macrófagos J774 (A), Lipo (B), Lipo-Fuc ₅ (C) e Lipo-Fuc ₁₀ (D).	57
Figura 13-	Quantificação por citometria de fluxo da internalização do Lipo (A), Lipo-Fuc ₅ (B), e Lipo-Fuc ₁₀ (C) por macrófagos J774.	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Fármacos em fase de estudo II e III para o tratamento Anti-TB.	26
Tabela 2 –	Nanossistemas utilizados para encapsulamento de antibióticos com atividade antimicobacteriana. RIF: Rifampicina; INH: Isoniazida; PZA: Pirazinamida.	33
Tabela 3 –	Caracterização físico-química das formulações lipossomais.	55
Tabela 4 –	Atividade frente a macrófagos infectadas pelo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> após 42 dias de incubação. As cruzes correspondem ao número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC), da seguinte forma: 0-5 UFC: +; 6-10 UFC: ++; 11-15 UFC: +++; 16-20 UFC: ++++; >20 UFC: +++++.	65

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1	TUBERCULOSE: UMA PANDEMIA.....	20
2.2	ERRADICAÇÃO DA TUBERCULOSE: UMA LUTA GLOBAL.....	22
2.3	TERAPIAS ANTI-TUBERCULOSE.....	24
2.4	DESCOBRIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS PARA A TERAPIA ANTI-TB.....	25
2.4.1	Ácido úsnico.....	27
2.5	NOVAS ESTRATÉGIAS PARA A ERRADICAÇÃO DA TUBERCULOSE..	31
2.5.1	Nanossistemas.....	31
2.5.2	Fucana: um ligante sítio-específico em potencial.....	38
3	OBJETIVOS.....	41
3.1	OBJETIVO GERAL.....	41
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
4	METODOLOGIA.....	42
4.1	EXTRAÇÃO DA FUCANA, PURIFICAÇÃO E CONJUGAÇÃO COM O COLESTEROL.....	42
4.1.1	Extração da fucana.....	42
4.1.2	Hidrólise da fucana.....	42
4.1.3	Síntese do colesteroil-fucana.....	43
4.2	OBTENÇÃO DA FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL SÍTIO-ESPECÍFICA CONTENDO ÁCIDO ÚSNICO.....	44
4.3	DOSEAMENTO DO ÁCIDO ÚSNICO E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO EM LIPOSSOMAS.....	45
4.4	ESTUDO DE VISUALIZAÇÃO MICROSCÓPICA DE INTERNALIZAÇÃO CELULAR DOS LIPOSSOMAS EM MACRÓFAGOS J774.....	45
4.5	AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE ENDOCITOSE.....	46
4.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA FRENTE A MACRÓFAGOS INFECTADOS COM <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> H37RA.....	46
4.6.1	Microrganismo.....	46

4.6.2	Preparo do inóculo.....	47
4.6.3	Infecção dos macrófagos.....	47
4.6.4	Tratamento.....	47
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA FUCANA E DO COLESTEROIL-FUCANA.....	49
5.2	CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES.....	52
5.3	ESTUDO DE VISUALIZAÇÃO MICROSCÓPICA DE INTERNALIZAÇÃO CELULAR DOS LIPOSSOMAS EM MACRÓFAGOS J774.....	56
5.4	AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE ENDOCITOSE.....	58
5.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA FRENTE A MACRÓFAGOS INFECTADOS COM <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> H37RA.....	63
6	CONCLUSÃO.....	68
	REFERÊNCIAS.....	69
	APÊNDICE A - ARTIGO SUBMETIDO NA REVISTA <i>PHYTOCHEMISTRY REVIEWS</i>.....	84

1 INTRODUÇÃO

O *Mycobacterium tuberculosis* é uma bactéria que é transmitida através de gotículas contaminadas presentes no ar. Essas gotículas são inaladas pelo trato respiratório do novo hospedeiro, propiciando a disseminação da tuberculose (TB) (NARASIMHAN, 2013). Em 2018, a TB causou a morte de 1,2 milhões de pessoas em média, além de outras 251 mil mortes entre pessoas portadoras do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). Dentro dos países que formam o BRICS (Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul), a África do Sul é o país onde ocorre a maior incidência da tuberculose, sendo registrados 567 novos casos. Logo após vem a Índia (204) e o Brasil aparece em último lugar, com 44 casos (BRASIL, 2017).

Em 1993, a *World Health Organization* (WHO) declarou a TB como uma emergência global, levando os países de todo o mundo a estabelecerem metas para reduzir a mortalidade desta epidemia. Fruto desta luta global contra a TB, foi criada a “*End TB Strategy*”, material que tem por objetivo erradicar a tuberculose (WHO, 2014). Nesse contexto, há o incentivo para o desenvolvimento de pesquisa e inovação para a aplicação de novas ferramentas, estratégias e intervenções que garantam a erradicação da TB (WHO, 2014).

Vale salientar que apenas em 1993 a TB foi tida como problema de saúde pública mundial, mas a luta contra o *M. tuberculosis* é antiga, uma vez que desde 1946 são pesquisados fármacos com atividade Anti-TB, a exemplo da estreptomicina, um antibiótico extraído a partir da *Streptomyces griseus*. (SCHATZ, 1944; WASSERSUG, 1946). Com o avanço das pesquisas, em 1950 foi lançado o regime terapêutico padrão-ouro para o tratamento da TB, utilizando a isoniazida, rifampicina, pirazinamida e o etambutol, adotado até os dias atuais (BLUMBERG, 2003; TIBERI et al., 2018). Porém, apesar da efetividade destes fármacos para o tratamento da TB, o *Mycobacterium tuberculosis* vem apresentando resistência, acarretando o surgimento de cepas multidroga resistentes (*multidrug-resistant TB*, MDR-TB), extensivamente resistentes a drogas (*extensively drug-resistant TB*, XDR-TB), bem como as cepas totalmente resistentes (*totally drug-resistant TB*, TDR-TB), quando estas apresentam resistências a todos os 4 fármacos de primeira linha, bem como a todos os fármacos de segunda linha (KOUL, 2011).

Além da resistência, os pesquisadores apontam vários outros desafios na terapia Anti-TB como a intolerância e a toxicidade apresentadas pelos fármacos,

causando a interrupção do tratamento e a consequente mudança no regime terapêutico (ZUMLA, 2013; BAHUGUNA; RAWAT, 2020). Assim, novas alternativas para o tratamento da tuberculose é de suma importância, a fim de superar as dificuldades encontradas.

Desde o isolamento da estreptomicina a partir da *Streptomyces griseus* em 1944 por Waksman and Schatz (AHMAD, 2011), a busca por novas moléculas para o tratamento da Tb tem favorecido a descoberta de novos ativos, como a rifamicina B, a rifampicina, amicacina e canamicina (WHO, 2010). Diante do incessante trabalho dos pesquisadores, outras moléculas com atividade anti-Tb foram descobertas, e entre elas, o ácido úsnico (AU), um metabólico secundário extraído de líquens (MÜLLER, 2001; DE CARVALHO et al., 2005; ODABASOGLU et al., 2006) o qual vem sendo estudado por apresentar diversas atividades biológicas incluindo atividade antimicobacteriana (HONDA, 2010). Apesar das muitas atividades biológicas, a utilização do ácido úsnico na sua forma livre é limitada uma vez que apresenta elevada toxicidade (BROWN, 2017), e dentre elas, a hepatotoxicidade (PRAMYOTHIN, 2004) e a cardiotoxicidade (YOKOUCHI, 2015).

Levando em consideração que o *M. tuberculosis* é um parasita intracelular obrigatório (RANJBAR, 2015), alguns autores citam que o aparecimento da resistência aos antimicrobianos utilizados na atualidade deva-se à baixa concentração do fármaco dentro do macrófago, consequência da baixa penetração dos ativos dentro destas células, acarretando redução dos níveis terapêuticos dos mesmos (ALI, 2016). Assim, levando em consideração às características físico-químicas do AU, atrelada à baixa penetração dos fármacos no macrófago, desenvolver uma terapia que aumente a concentração dos fármacos dentro dos macrófagos e diminua a toxicidade do AU é uma proposta promissora no tratamento da TB. Desta forma, vários autores têm utilizado nanossistemas como alternativa norteadora para o tratamento da TB (BASHA, 2019).

Dentre os diversos tipos de nanossistemas utilizados para veicular ativos para o interior dos macrófagos, como por exemplo nanopartículas poliméricas (BASHA et al., 2019); dendrímeros (KUMAR et al., 2006) e micropartículas (AHSAN et al., 2002), a literatura mostra que os lipossomas têm sido amplamente estudados (AHSAN, 2002), para a finalidade de diagnóstico (GEELLEN, 2012) e tratamento de patologias associadas à macrófagos (PETAZZI, 2015), a fim de veicular antibióticos para o interior destas células (CHANGSAN, 2009). A utilização de lipossomas para o

tratamento de doenças pulmonares apresenta algumas vantagens, como a utilização de lipídios biodegradáveis, resultando na obtenção de produtos de degradação endógenos não tóxicos e a possibilidade de obter lipossomas na escala nanométrica, o que permite a encapsulação destas vesículas em nanopartículas capazes de sofrerem aerolização, favorecendo o desenvolvimento de formulações para serem administradas pela via nasal (PILCER, 2010; WEBER, 2014). Além destas características, os lipossomas apresentam a capacidade de encapsular dois ou mais agentes terapêuticos, uma vez que a bicamada lipídica é constituída por uma porção lipofílica e outra hidrofílica (AKHTER, 2018). Diante disso, vários autores têm desenvolvido lipossomas contendo ativos com propriedades anti-Tb, e dentre estes, lipossomas contendo ácido úsnico (FERRAZ-CARVALHO, 2016).

Atrelado à utilização da nanotecnologia, o uso de moléculas sinalizadoras, como os polissacarídeos, permite o direcionamento dos nanossistemas para tecidos e órgãos específicos do organismo, local onde o fármaco pode ser liberado e desta forma desempenhar suas propriedades farmacológicas (UPADHYAY, 2019). A fucana, polissacarídeo sulfatado extraído de algas marrons (FLÓREZ-FERNÁNDEZ et al., 2018), ouriço do mar (VILELA-SILVA et al., 2002) e pepino do mar (RIBEIRO et al., 1994) a qual apresenta notórias atividades biológicas (OLIVEIRA, 2019; ZHURISHKINA, 2020) pode ser utilizada como uma possível molécula sinalizadora para o tratamento da TB, uma vez que os macrófagos expressam receptores (*macrophages scavenger receptors*) capazes de reconhecerem a fucose. Além disso, os macrófagos podem interagir com a carga negativa dos grupamentos sulfato presentes na fucana (SHAMAY et al., 2016).

Assim, o objetivo deste trabalho foi primeiramente avaliar a captura celular e o mecanismo de endocitose de lipossomas sítio-específicos revestidos com fucana frente a macrófagos J774, e posteriormente, avaliar o efeito antimicobacteriano do ácido úsnico encapsulado em lipossomas sítio-específicos revestidos com fucana, frente a macrófagos J774 infectados com *M. tuberculosis*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

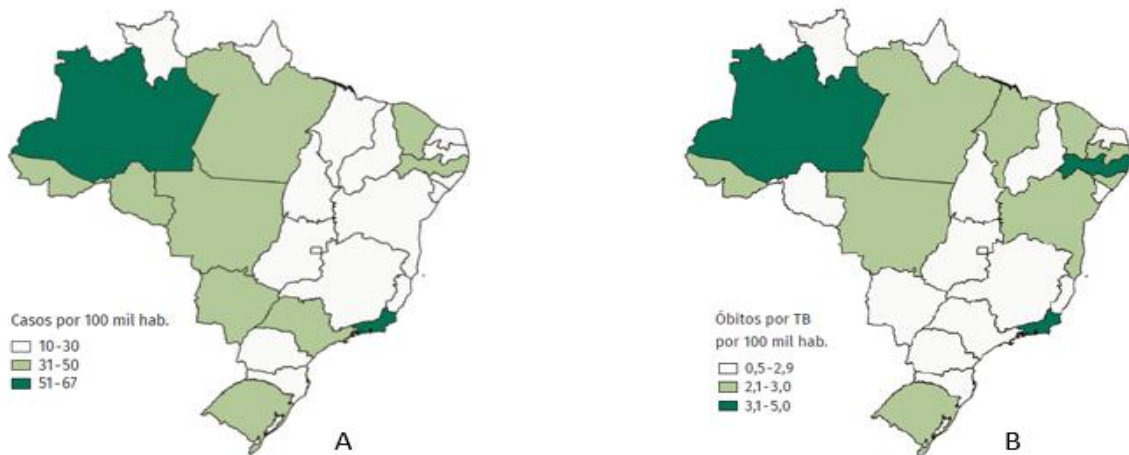
2.1 TUBERCULOSE: UMA PANDEMIA

Em 2018, a tuberculose (TB) causou 1,2 milhões (1,1 – 1,3 milhões) de mortes entre pessoas HIV negativas, além de 251 mil (223.000 – 281.000) novos casos de morte entre pessoas HIV positivas. Além destes dados, existe uma estimativa de 10 milhões (9,0 – 11,1 milhões) de novos casos de tuberculose em todo o mundo, sendo este valor equivalente a 133 casos a cada 100.00 habitantes (WHO, 2019).

A tuberculose afeta todos os países e todas as faixas etárias. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2017, 90% dos casos ocorreram em adultos (≥ 15 anos), sendo 64% homens e 9% pessoas convivendo com o HIV (WHO, 2018). Os países mais afetados pela doença são: Índia (27%), China (9%). Indonésia (8%), Filipinas (6%), Paquistão (5%), Nigéria (4%), Bangladesh (4%) e África do Sul (3%). Os países formadores do BRICS (Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul), a África do Sul é aquele com a maior incidência da tuberculose, onde foram registrados 567 novos casos, vindo logo após a Índia (204), China (63), Rússia (60) e Brasil (44) (BRASIL, 2017).

De acordo com o Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose como Problema de Saúde Pública, material preparado pelo Ministério da Saúde Brasileira, a incidência da tuberculose varia de acordo com cada unidade da federação. Os estados do Amazonas e do Rio de Janeiro foram os que apresentaram maior risco para a tuberculose (67,2 para cada 100 mil habitantes). Por outro lado, o Distrito Federal apresentou o menor risco (10,5 para cada 100 mil habitantes) (figura 1A).

Figura 1: Incidência (A) e coeficiente de mortalidade (B) da Tuberculose por Unidade Federativa. Dados até fevereiro de 2017.

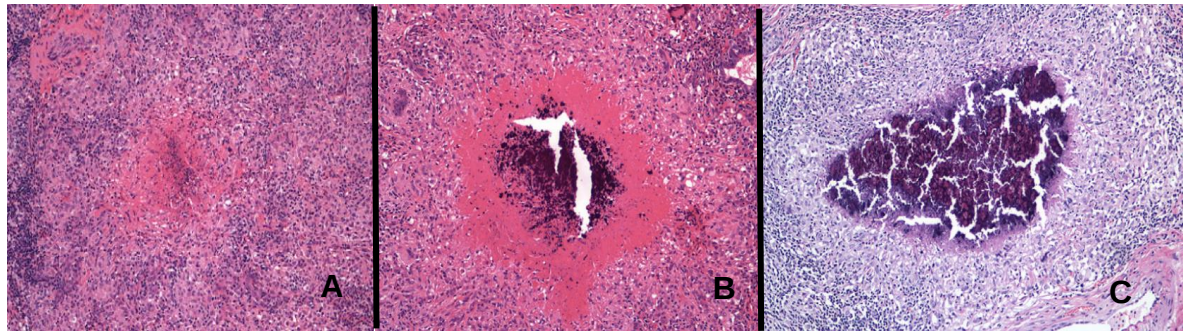


Fonte: Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose como Problema de Saúde Pública (BRASIL, 2017).

Levando em consideração o coeficiente de mortalidade, os estados do Rio de Janeiro e Pernambuco são aqueles que apresentam os maiores índices (5,0 e 4,5 óbitos por tuberculose/100 mil habitantes, respectivamente) (figura 1B) (BRASIL, 2017).

A tuberculose é uma doença causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), através de gotículas contaminadas presentes no ar, as quais são inaladas pelo trato respiratório do novo hospedeiro (NARASIMHAN et al., 2013). Após a entrada do Mtb nos pulmões, o sistema imune desencadeia a formação do granuloma (figura 2), estrutura imune complexa formada por vários tipos de células, como macrófagos, neutrófilos e linfócitos T e B. A função do granuloma é conter a infecção, a fim de proteger o tecido circundante. Primeiramente são formados os granulomas caseosos, compostos por um núcleo de células mortas circundadas por células vivas, ocorrendo após a formação dos granulomas supurativos, formado por um infiltrado de neutrófilos. Por fim, ocorre a formação do granuloma fibrótico, o qual apresenta colágeno distribuído ao redor do agregado de células. A calcificação do granuloma caracteriza seu estágio final de formação (tubérculo) (ORME; BASARABA, 2014).

Figura 2. Evolução das lesões granulomatosas. Decorridos 20-30 dias da infecção, as lesões granulomatosas se desenvolvem e começam a evidenciar uma necrose na região central (A). Com o passar do tempo, o local afetado demonstra reparo tecidual, o qual apresenta tecido fibroso com posterior calcificação (B). Após 60-100 dias, as lesões necróticas são completamente substituídas por tecido de calcificação, denominado tubérculo (C)



Fonte: ORME; BASARABA, 2014.

Além da tuberculose pulmonar, a literatura cita a existência da tuberculose extrapulmonar, a qual se distribui por todo o corpo humano através da corrente sanguínea. Para este tipo de doença os autores usam o termo tuberculose miliar, onde primeiramente a doença se manifesta nos pulmões, porém alcança os outros órgãos através da circulação linfática e circulação sanguínea. Os Centros de Controle e Prevenção (*The Centers for Disease Control and Prevention (CDC)*) dos Estados Unidos declaram que os locais mais comuns onde é encontrada a tuberculose extrapulmonar são os linfonodos, a cavidade pleural que circunda os pulmões, ossos e articulações e o sistema nervoso central (HEYMANN et al., 2008).

2.2 ERRADICAÇÃO DA TUBERCULOSE: UMA LUTA GLOBAL

Em 1993 a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a tuberculose como uma emergência global, de forma que entre os anos de 2000 e 2015 foram estabelecidas metas a fim de reduzir em 50% a mortalidade causada por esta epidemia. Logo após, foi criada a “*End TB Strategy*”, a qual tinha por objetivo erradicar a tuberculose (WHO, 2014). Para isto, a OMS estabeleceu um conjunto de metas para os anos de 2025 e 2035, incluindo: redução de 75% das mortes causadas pela tuberculose, em comparação com o ano de 2015, bem como redução

de 50% da taxa de incidência da doença. Já para o ano de 2035, o “*End TB Strategy*” possui como metas: redução de 90% das mortes causadas pela TB, em comparação com o ano de 2015 e redução de 90% da taxa de incidência da TB.

Além das importantes metas estabelecidas pela OMS, alguns pilares cruciais para a erradicação da tuberculose foram estabelecidos, como: 1) Cuidados e ações preventivas centradas no paciente: este pilar foca no diagnóstico precoce da tuberculose, além de proporcionar o tratamento de todas os indivíduos portadores da tuberculose sensível e tuberculose resistente aos medicamentos, respectivamente; 2) Criação de Políticas robustas: fomentar o compromisso político, atentando para o cuidado e prevenção da tuberculose, bem como voltar a atenção da comunidade global para este tema. Proporcionar a notificação dos casos, promover a racionalização dos medicamentos e propiciar o controle da infecção; 3) Pesquisa e inovação: este pilar foca na descoberta, no desenvolvimento e na aplicação de novas ferramentas, estratégias e intervenções que garantam a erradicação da tuberculose, além de pesquisas que visem o aprimoramento destas ferramentas e o impacto das mesmas (WHO, 2014). A otimização das atuais ferramentas e a introdução de novas, como vacinas, novos medicamentos e regimes terapêuticos mais eficazes contra a TB sensível e TB latente, permitirão que os objetivos que visam a erradicação global da tuberculose sejam alcançados (DYE et al., 2013).

Em relação ao investimento para a pesquisa em todo o mundo, entre o ano de 2009 e 2016 foram investidos US\$ 4,9 bilhões, dos quais 61% foram destinados ao desenvolvimento de novas ferramentas para diagnóstico, desenvolvimento de novas vacinas e para a descoberta de novos fármacos. Por outro lado, 21% foram destinados para pesquisa básica, 10% para pesquisa operacional e 8% para infraestrutura ou projetos não especificados (WHO, 2018). Os EUA foram responsáveis por US\$ 1,8 bilhões, vindo logo após a União Europeia e o Reino Unido, com um investimento de US\$ 268 milhões cada. Os investimentos vindos de outros países não excederam US\$ 62 milhões (WHO, 2018).

Os países que formam o BRICS (Brasil, Rússia, China e África do Sul) anunciaram em 2017 a formação de uma rede de pesquisa Anti-TB. O principal objetivo desta rede é intensificar as pesquisas e a inovação, a fim de que novas ferramentas sejam desenvolvidas na batalha contra a tuberculose. Levando em consideração que 46% dos casos notificados em todo o mundo encontram-se nos países formadores do BRICS, este bloco é responsável por 54% (US\$ 3,7 bilhões)

do financiamento global Anti-TB (US\$ 6,9 bilhões) (WHO, 2018). Assim, espera-se que o engajamento mundial para o controle e a erradicação da tuberculose proporcione a criação de terapias entre as quais o descobrimento de fármacos com ação anti-TB, bem como a aplicação de novas tecnologias.

2.3 TERAPIAS ANTI-TUBERCULOSE

Em 1946 deu-se início o tratamento Anti-Tb com a utilização da estreptomicina, um antibiótico extraído da *Streptomyces griseus* (SCHATZ; BUGLE; WAKSMAN 1944; WASSERSUG, 1946). Apesar de pequenos estudos observacionais mostrarem que este fármaco se apresentava como uma nova esperança para o tratamento do *Mycobacterium tuberculosis*, a capacidade de cura ainda era questionável. Na época, começou a ser sugerido que a resistência bacteriana aos medicamentos estava ligada a terapias que faziam uso de apenas um agente no tratamento (MARSHALL, 1949). A partir de então, e com o avanço das pesquisas, novos fármacos foram adicionados à terapia Anti-TB. Os fármacos de primeira linha englobam: isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol (PYM; COLE 2008; SHI et al., 2011). Os fármacos de segunda linha: ácido para-amino salicílico (CHAKRABORTY et al., 2013), etionamida (PYM; COLE 2008), ofloxacino (PYM; COLE 2008; SIRGEL et al., 2012), capreomicina (SIRGEL et al., 2012), canamicina (SALIAN et al., 2012), amicacina (SIRGEL et al., 2012) e cicloserina (BRUNING et al., 2010).

A partir de 1950 foi lançado um regime terapêutico padrão-ouro para o tratamento da TB, utilizando a isoniazida, rifampicina, pirazinamida e o etambutol, o qual é utilizado até hoje. Este regime foi proposto a partir de uma parceria firmada entre o Serviço de Saúde Pública dos Estados Unidos (*United States Public Health Service* - USPHS) e a Unidade de Tuberculose do Conselho de Pesquisa Médica (*Medical Research Council* - MRC) do Reino Unido. O tratamento é constituído por duas fases. Na primeira fase, o paciente é submetido a um regime de 2 meses utilizando isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol. Já na segunda fase de tratamento, o regime exige o uso de isoniazida e rifampicina durante 4 meses, totalizando 6 meses de tratamento (MARSHALL, 1949; BLUMBERG et al., 2003)

Apesar da efetividade destes fármacos para o tratamento da TB sensível, sabe-se da ocorrência de resistência por parte do *Mycobacterium tuberculosis* aos

fármacos utilizados na terapia atual. As cepas da TB podem apresentar características do tipo multidroga resistentes (*multidrug-resistant TB*, MDR-TB), quando estas apresentam resistência a isoniazida ou a rifampicina, extensivamente resistentes a drogas (*extensively drug-resistant TB*, XDR-TB), quando estas apresentam resistência não apenas a rifampicina e isoniazida, mas também às fluoroquinolonas e aos aminoglicosídeos de segunda-linha, e as cepas totalmente resistentes (*totally drug-resistant TB*, TDR-TB), quando estas apresentam resistências a todos os 4 fármacos de primeira linha, bem como a todos os fármacos de segunda linha (KOUL et al., 2011).

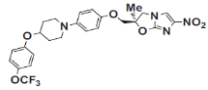
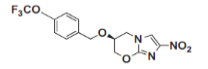
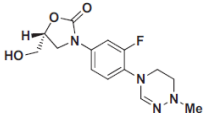
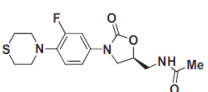
Além da resistência associada aos fármacos, os pesquisadores apontam outros desafios na terapia Anti-TB, como a toxicidade dos medicamentos, uma vez que estes apresentam hepatotoxicidade (ANAND, 2006; KUMAR, 2010), ototoxicidade (SHIBESHI, 2019; SARIN, 2019), e nefrotoxicidade (DE JAGER, 2002; YANG, 2017), interações do tipo fármaco-fármaco no uso de retrovirais durante o tratamento de pacientes coinfectados com HIV e a baixa adesão ao tratamento por parte dos pacientes, uma vez que se faz necessário a utilização dos medicamentos durante um longo período (ZUMLA; NAHID; COLE, 2013). Neste sentido, a busca por novas alternativas para o tratamento da tuberculose é eminente, seja a partir da utilização de novos fármacos ou no desenvolvimento de formas farmacêuticas inovadoras capazes de carrear fármacos para os macrófagos infectados.

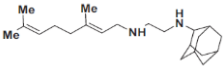
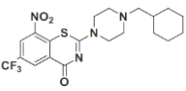
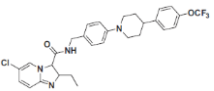
2.4 DESCOBRIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS PARA A TERAPIA ANTI-TB

Além da aprovação de guias terapêuticos validados, o desenvolvimento de novos fármacos para a terapia anti-TB exige outros critérios, como: o novo candidato deve apresentar maior potência quando comparado aos fármacos utilizados na terapia atual, visando a redução no tempo do tratamento da Tb; o ativo deve apresentar novos alvos farmacológicos, permitindo o tratamento da MDR-TB bem como da XDR-TB; deve ser compatível com a terapia antirretroviral, evitando interações do tipo fármaco-fármaco e não apresentar antagonismo contra os fármacos já estabelecidos, permitindo que sejam estabelecidos protocolos que utilizem mais de um fármaco (BARRY et al., 2009; ZUMLA, NAHID; COLE, 2013 2013).

Os novos candidatos recentemente aprovados para a terapia Anti-TB estão sumarizados na tabela 1. Alguns destes encontram-se em fase II ou III de testes clínicos.

Tabela 1: Fármacos em fase de estudo II e III para o tratamento Anti-TB

Fármaco	Classe química	Efeito	Tipo de TB	Fase de estudo clínico	Estrutura química
Delamanida	Nitroimidazol	Inibição da síntese do ácido micólico	MDR-TB	Fase III	
Pretomanida	Nitroimidazol	Inibição da síntese da parede celular; desacoplamento respiratório	MDR-TB	Fase II	
Delpazolida	Oxazolidinona	Inibe a síntese proteica	-	Fase II	
Sutezolida	Oxazolidinona	Inibe a síntese proteica	MDR-TB e TBse	Fase II	

SQ109	Diamina	Inibe a síntese da parede celular	DS-TB	Fase II	
PBTZ169	Benzotiazinona	Inibe a síntese da parede celular	MDR-TB	Fase II	
Q203	Imidazopiridina	Inibe a síntese de ATP	-	Fase I	

Fonte: (BAHUGUNA; RAWAT 2020).

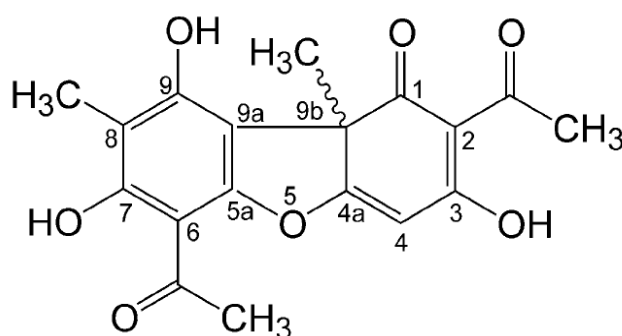
2.4.1 Ácido úsnico

Levando em consideração o terceiro pilar do *End TB Strategy*, o qual estimula a descoberta de novos fármacos para a terapia contra a tuberculose, o Ácido Úsnico (AU) pode ser considerado como um promissor candidato para o tratamento desta epidemia, uma vez que a literatura evidencia sua atividade Anti-TB (HONDA et al., 2010). O ácido úsnico (2,6-diacetil-7,9-dihidroxi-8-9b-dimetil-1,3(2H,9β/αH)-dibenzofurandiona) é um composto de cor amarela, extraído de líquens de várias espécies, como: *Usnea deffractas* (MÜLLER, 2001), *Lecanora pseudogangalevides* (LUMBSCH, 1995), *Usnea laevis* (MARCANO; RODRIGUEZ-ALCOCER; MÉNDEZ, 1999), *Roccella montagnei* (VIJAYAKUMAR et al., 2000), *Sticta weigeli* (PIOVANO et al., 2000), *Cladonia substellata* (DE CARVALHO et al., 2005) e *Usnea longissima* (ODABASOGLU et al., 2006).

O ácido úsnico (figura 3) ocorre na natureza em duas formas enantioméricas, (-) e (+). Tais formas são possíveis devido a projeção angular do grupamento metila localizado na posição 9b (COCCHIETTO; SKERT; NIMIS; SAVA, 2002; INGÓLFSDÓTTIR, 2002). A presença dos três grupos cetônicos, do anel furano e das pontes de hidrogênio intramoleculares conferem à molécula caráter hidrofóbico, apresentando uma solubilidade em água menor que 10mg/100ml, à 25°C (ASAHINA

& SHIBATA, 1954; TAKAI & UEHARA, 1979; MÜLLER, 2001; INGÓLFSDÓTTIR, 2002). O grupo hidroxila presente na posição 3 possui valor de pKa de 4,4, causado pelo efeito indutivo do grupo cetônico na posição 1. Por outro lado, para o grupo hidroxila fenólico na posição 9, o pKa é de 8,8 devido ao efeito indutivo causado pelo grupo para-acetil localizado na posição 6. Para o grupo hidroxila localizada na posição 7, o pKa é de 10,7, provavelmente pela interação intramolecular através de pontes de hidrogênio com o grupo acetil, na posição 6 (SHARMA; JANNKE et al., 1966).

Figura 3. Estrutura química do ácido úsnico.



Fonte: INGÓLFSDÓTTIR, 2002.

Recentemente foi comprovado que as hidroxilas conferem à molécula do AU propriedades protonofóricas, de sorte que este derivado liquênico forma dímeros com o íon Ca^{2+} do tipo AU-Ca-AU (ANTONENKO et al., 2019). Os autores observaram que, ao complexar-se com o Ca^{2+} , o AU promove uma resposta dose-dependente na indução de corrente elétrica através da bicamada lipídica. Além disso, concluíram que cada hidroxila é de suma importância para tal fenômeno, posto que a remoção de qualquer uma delas acarreta a redução da indução da corrente elétrica.

Antonenko e colaboradores (2019) comprovaram a atividade desacopladora do ácido úsnico sobre a respiração mitocondrial. Foram avaliados os efeitos do AU e de seus análogos (moléculas de ácido úsnico com modificações químicas nas hidroxilas) sobre o potencial de membrana mitocondrial. Os autores viram que o AU suprimiu o potencial de membrana em uma concentração muito menor quando comparado com seus análogos.

O interesse terapêutico pelo ácido úsnico começou a partir da utilização de líquens na medicina popular, visando o tratamento da tuberculose pulmonar e algumas doenças de pele (INGÓLFSDÓTTIR; BLOOMFIELD; HYLANDS, 1985). Com o passar do tempo e intensificando as pesquisas sobre o AU, outras atividades biológicas foram atribuídas a este derivado liquênico. A atividade antitumoral do ácido úsnico foi revelada há quase quatro décadas. Em 1975, Kupchan e Kopperman publicaram o primeiro estudo contra o carcinoma pulmonar de Lewis. Desde então, os estudos *in vitro* do ácido úsnico demonstraram sua ação antitumoral frente à diferentes linhagens celulares, tais como queratinócitos humanos (HaCaT) (KUMAR; MÜLLER, 1999; PEREIRA et al., 1994; BURLANDO et al., et al., 2009), células de câncer de mama (MCF7 e MDAMB231) e de câncer de pulmão (H1299 e NCIH 292) (MAYER et al., 2005). Recentemente, Kumar e colaboradores (2020) investigaram as alterações moleculares associadas com a atividade anticâncer do AU contra adenocarcinoma gástrico humano (AGS) e carcinoma gástrico SNU-1. Os autores viram que o AU promoveu apoptose das células cancerígenas através da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) dentro da célula, além de causar dano ao DNA. De forma importante, os autores relatam que a concentração do AU que levou à apoptose células de câncer gástrico, não mostrou toxicidade às células embrionárias de rins (HEK293), nem a queratinócitos humanos (HaCat) e nem às células gástricas primárias de ratos.

A literatura também faz menção sobre a atividade antiviral do AU, de forma que diferentes tipos virais têm sido alvo do ácido úsnico. Inicialmente, este composto liquênico foi testado contra o Epstein-Barr, Papilomavírus Humano e o Poliomavírus de ratos (SCIRPA et al., 1999;). Em 1995, Yamamoto e colaboradores testaram as duas formas enantioméricas do ácido úsnico, contra o Epstein-Barr vírus. Os resultados mostraram que a forma dextrogira apresentou maior atividade antiviral em relação à levogira. Já no trabalho proposto por Sokolov e colaboradores (2012), os autores estudaram pela primeira vez a atividade antiviral do AU e seus derivados contra o vírus influenza A (H1N1) pdm09, avaliando as duas formas enantioméricas do AU [(+)-AU e (-)-AU]. Os resultados mostraram que o AU apresentou maior atividade quando comparado com seus derivados, de forma que o enantiômero (-)-AU foi mais efetivo quando comparado com o (+)-AU.

Sussmann e colaboradores (2011), impulsionados pela resistência parasitária aos medicamentos convencionais, testaram o ácido úsnico frente ao *Plasmodium*

falciparum. Nesta busca por novas drogas alvo, os pesquisadores descobriram no ácido úsnico uma importante ação contra o parasita uma vez que ele inibiu de forma reversível a biossíntese de vitamina E, uma importante molécula para o desenvolvimento do parasita. Recentemente, Araújo e colaboradores (2020) avaliaram o potencial esquistossomicida do sal de potássio do AU (PS-UA), analisando a motilidade, mortalidade, viabilidade celular e as alterações do tegumento do *S. mansoni* por microscopia eletrônica de varredura. Os autores viram que em diferentes intervalos de exposição, o PS-UA causou alterações como: contração dorsoventral, descamação, inchaço, erosão, exposição de tecido subtegumentar e desintegração do tegumento. Os resultados mostram ainda que as alterações na motilidade e mortalidade foram dependentes da concentração e do tempo, de forma que mesmo em baixa concentração, o PS-UA foi capaz de causar profundas mudanças ultraestruturais no tegumento dos vermes.

Sobre a atividade antimicrobiana do ácido úsnico, os estudos pioneiros mostram que este derivado liquênico apresenta atividade contra a espécie *Streptococcus mutans* (agente etiológico da cárie dental) (GRASSO et al., 1989) e contra os gêneros *Escherichia*, *Salmonella* e *Shigella* (HALE-Jr, 1983). Com o avanço nas pesquisas, foi demonstrada também a ação do AU contra cepas resistentes a antibióticos, como por exemplo a *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (SARM) e a *Enterococos* resistente à vancomicina (ERV) (ELO et al, 2007).

Em um estudo feito por Francolini e colaboradores (2004), a atividade antimicrobiana do AU foi explorada no controle do crescimento de biofilme pelas cepas de *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Apesar de não inibir a fixação inicial das bactérias de *S. aureus* nas superfícies artificiais de polímero (*in situ*), o AU foi capaz de matar as bactérias uma vez já aderidas, inibindo assim a propagação do biofilme.

Além de demonstrar atividade contra as cepas microbianas elencadas acima, vale destacar o trabalho de Honda e colaboradores (2010), onde os autores avaliaram a atividade anti-TB de 26 derivados liquênicos, incluindo o ácido úsnico, frente a cepa H37Rv do *Mycobacterium tuberculosis*. Os resultados mostraram que o AU foi o terceiro metabólito mais ativo contra o *M. tuberculosis*, apresentando um MIC de 62,5 µg/ml, (182 mM). No trabalho proposto por Ramos e Almeida da Silva (2010), onde o objetivo foi avaliar a atividade antimicrobiana do AU frente à isolados

clínicos suscetíveis e resistentes do *M. tuberculosis*, os autores relatam que as cepas alvo deste estudo apresentavam uma alteração molecular responsável pela presença de bombas de efluxo, causadores da resistência micobacteriana contra rifampicina, isoniazida e estreptomicina. Primeiramente os resultados mostram que o AU apresentou atividade contra as cepas suscetíveis. Em seguida, os autores puderam ver que mesmo dotadas de mecanismos de resistência, como as bombas de efluxo, as bactérias foram suscetíveis ao AU, de forma que este fármaco superou o mecanismo de resistência bacteriano.

Assim, o AU destaca-se por sua comprovada atividade antimicrobiana, principalmente contra as cepas do *M. tuberculosis*, uma vez que em altas concentrações (10 μ M) este fármaco apresenta características de desacoplador da cadeia transportadora de elétrons (MOREIRA, 2013). Além de eficaz atividade anti-TB este ativo não promoveu resistência às micobactérias (RAMOS; ALMEIDA DA SILVA, 2010) o que atende à proposta da OMS na busca por novos fármacos para o tratamento da tuberculose. Porém, o AU não pode ser administrado em sua forma livre, uma vez que este ativo apresenta elevada toxicidade (BROWN, 2017) sendo hepatotóxico (PRAMYOTHIN, 2004), cardiotoxico (YOKOUCHI, 2015) além de possuir propriedades alergênicas (SALO, 1981; SHEU, 2006; PACHECO, 2014).

Desta forma, uma saída bastante promissora para reduzir os efeitos adversos sistêmicos causados pelo AU e ainda assim desfrutar da sua propriedade antimicrobiana é a encapsulação deste ativo em sistemas de liberação controlada de fármacos.

2.5 NOVAS ESTRATÉGIAS PARA A ERRADICAÇÃO DA TUBERCULOSE

2.5.1 Nanossistemas

Um dos grandes desafios no tratamento da TB é a baixa penetração dos fármacos dentro dos macrófagos, local onde reside o *M. tuberculosis*. Assim, com baixa concentração dos fármacos dentro dos macrófagos, os fármacos agem em níveis subterapêuticos, favorecendo o surgimento de resistência por parte das cepas microbianas (ALI et al., 2016). Desta forma, desenvolver uma terapia que promova o aumento da concentração dos fármacos dentro dos macrófagos é uma proposta bastante útil no tratamento da TB (PI et al., 2019).

Vários autores têm voltado seus esforços para a utilização da nanotecnologia, em especial no desenvolvimento de nanossistemas como terapia norteadora para o tratamento da TB. Basha e colaboradores (2019) preparam nanopartículas a partir de curdlan, uma glucana linear (β -1,3) produzida por microrganismos do gênero *Agrobacterium*, *Rhizobium*, e *Alcaligenes faecalis*, a qual é reconhecida por receptores do tipo dectina-1, expressa em macrófagos. Os autores encapsularam nas nanopartículas de curdlan a rifampicina, fármaco de primeira linha, e a levofloxacina, fármaco de segunda linha, ambos utilizados na terapia Anti-TB. Um dos objetivos do trabalho foi avaliar a atividade bactericida dos fármacos livres *versus* fármacos encapsulados nas nanopartículas de curdlan contra cepas do *M. smegmatis* cultivada em macrófagos RAW 264.7. Os resultados mostraram que a rifampicina encapsulada (CCDR) reduziu as unidades formadoras de colônias (UFC) em 90%, resultado superior quando comparado ao tratamento com o fármaco livre (53%). Avaliando a atividade da levofloxacina livre e encapsulada, o fármaco livre foi mais efetivo (93%) quando comparado com o fármaco encapsulado (75%). O autor justifica afirmando que a molécula da levofloxacina apresenta propriedades físico-químicas ideais de acordo com a lei de Lipinski para a captura por parte dos macrófagos (YANG, 2015): baixa lipofilicidade calculada (-0,51); peso molecular menor que 500 (361.36 g/mol); poucas ligações doadoras de hidrogênio (1 ligação) e menos que 10 ligações aceptoras de hidrogênio (7 ligações).

A estratégia de usar os macrófagos como alvo para a terapia Anti-TB é ser encontrada em outros trabalhos. Abdelghany e colaboradores (2019) utilizaram nanopartículas de PLGA modificadas com alginato para carrear amicacina e moxifloxacina, visando o tratamento da MDR-TB. Um dos objetivos foi avaliar a viabilidade *in vitro* da cepa bacteriana após infecção dos macrófagos com *M. tuberculosis* H37Ra e posterior tratamento utilizando as diferentes formulações. Os autores puderam observar que a encapsulação dos dois fármacos apresentou uma viabilidade bacteriana de 0,6% em relação ao grupo sem tratamento, enquanto nanopartículas encapsulando apenas um dos fármacos apresentou uma viabilidade bacteriana de 6,49% para amicacina e 3,27% para a moxifloxacina.

Lira e colaboradores (2009b) encapsularam o ácido úsnico (AU) em lipossomas e testaram sua atividade antimicobacteriana frente a cepas H37Rv do *M. tuberculosis*. Os autores também realizaram estudos de captura celular dos lipossomas contendo ácido úsnico (AU-LIPO) por macrófagos J774. A concentração

inibitória mínima (CIM) do AU livre e do AU encapsulado (AU-LIPO) foi de 6,5 e 5,8 µg/mL, respectivamente. Em relação ao IC₅₀, os resultados apontaram valores de 22,5 ± 0,60 e 12,5 ± 0,26 µg/ml para o AU livre e AU-LIPO, respectivamente. A captura celular do AU-LIPO foi maior ($21,6 \times 10^4 \pm 28,3 \times 10^2$ c.p.s) quando comparada com a captura do AU ($9,5 \times 10^4 \pm 11,4 \times 10^2$ c.p.s). Assim, os autores mostraram que O AU encapsulado apresentou maior atividade Anti-TB quando comparado ao AU livre, e que a encapsulação do AU aumentou o tempo de permanência do fármaco dentro do macrófago. Dando continuidade ao trabalho iniciado por Lira e colaboradores, Ferraz-Carvalho e colaboradores (2016) testaram a atividade do AU encapsulado em lipossomas (AU-Lipo) em combinação com a rifampicina (Rif) e isoniazida (INH) frente a isolados clínicos da TB Multi-Droga Resistente (MDR-TB). A concentração inibitória mínima (CIM) encontrada pelos autores foi de 31.25 e 0.98 µg/mL para o AU e para o AU-Lipo. Os resultados também apontaram sinergismo (índice de concentração inibitória fracionária) entre a RIF e o AU (ICIF= 0.31) e entre a rifampicina e o LIPO-AU (ICIF= 0.28). Já a INH não apresentou sinergismo com o AU ou AU-Lipo (ICIF: 1.30 - 2.50).

A literatura revela que a comunidade científica tem despertado para uma busca constante pelo desenvolvimento de nanossistemas contendo fármacos com atividade contra o *Mycobacterium tuberculosis*. Além das pesquisas descritas acima, outros trabalhos são encontrados na literatura onde os autores utilizaram nanossistemas para encapsular antibióticos para avaliar a atividade anti-TB como pode ser observado na tabela 2.

Tabela 2: Nanossistemas utilizados para encapsulamento de antibióticos com atividade antimicobacteriana. RIF: Rifampicina; INH: Isoniazida; PZA: Pirazinamida.

Nanossistema	Antibiótico	Vantagens
Nanopartículas de PLGA	RIF	No estudo <i>in vivo</i> revelou alta captura e alta retenção por macrófagos alveolares
Nanopartículas de polibutil-2- cianoacrilato	Moxifloxacino	Aumento da eficácia terapêutica <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>
Nanopartículas de PLGA com germe de trigo	RIF	Aumento da biodisponibilidade, com liberação prolongada do fármaco no plasma

Emulsão múltipla	INH	Alta eficiência de encapsulação (99%)
Dendrímeros	RIF	Aumento da captura seletiva por macrófagos e aumento da encapsulação do fármaco
	RIF	Aumento da solubilidade; liberação <i>in vivo</i> controlada até 120 h; aumento intracelular da concentração do fármaco
Nanocristais	Clofazimina	Redução da concentração bacteriana no pulmão
Lipossomas (fosfatidilcolina-colesterol)	PZA, Rifabutina	Redução da carga bacteriana; alta atividade antimicobacteriana
Lipossomas (fosfatidilcolina-colesterol)	INH, RIF	Redução das UFC nos pulmões
Gel micelar (caprolactona/coglicolida)	RIF	Liberação prolongada até 32 dias
Micelas (PLA/ quitosana)	RIF	Liberação prolongada até 5 dias

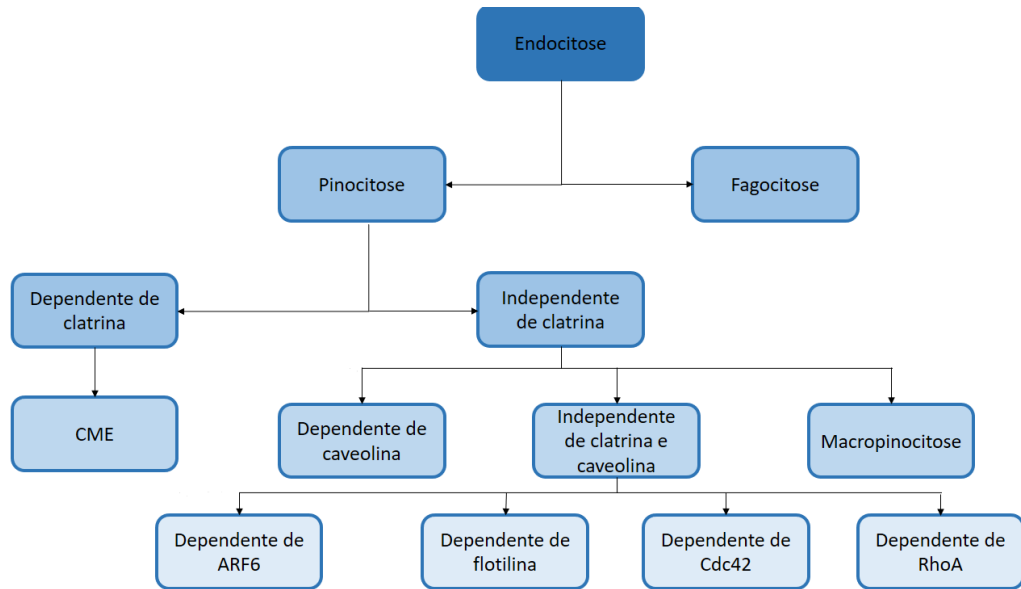
Fonte: HICKEY EL AL, 2016; MEHTA et al, 2018; PARUMASIVAM et al, 2016; PHAM; FATTAL; TSAPIS, 2015.

Os nanossistemas permitem a administração de fármacos de forma específica aos macrófagos, proporcionando uma maior biodisponibilidade do ativo no local da infecção intracelular, principalmente para os antibióticos com propriedades farmacocinéticas inadequadas (ABED; COUVREUR, 2014). Além de aumentar a biodisponibilidade, os nanossistemas impedem a degradação enzimática dos fármacos, bem como melhoram o transporte do ativo através da membrana plasmática do macrófago, permitindo que o fármaco alcance uma concentração terapêutica eficaz no local da infecção (DIAB et al., 2012). Ademais, estes dispositivos tem a capacidade de manter a concentração do fármaco durante um período de tempo prolongado através da liberação controlada do mesmo, reduzindo o número de doses necessárias durante o tratamento, diferente dos antibióticos em

sua forma livre, os quais geralmente apresentam baixa biodisponibilidade e desta forma, necessitam de múltiplas doses (XIONG et al., 2014).

Para que aconteça uma efetiva captura celular, algumas características físico-químicas dos nanossistemas precisam ser escolhidas, como tamanho, carga superficial, características hidrofóbicas/hidrofílicas da superfície, tipo de ligante presente na superfície e o tipo de célula alvo (REJMAN et al., 2004; CHELLAT; MERHI; MOREAU, 2005). Levando em consideração que os macrófagos apresentam múltiplas vias de captura, como a via clatrina, caveolina, macropinocitose e independente de clatrina, nanossistemas com diâmetro médio entre 300 e 500 nm são capturados mais rapidamente quando comparado aos nanossistemas com diâmetro médio de 150 nm (HE et al., 2010). Além de influenciar na captura celular, o tamanho dos nanossistemas também tem participação ativa no tipo de captura (REJMAN et al., 2004), visto que nanossistemas menores que 200 nm são prontamente capturados pela via dependente de clatrina, enquanto nanossistemas com tamanho até 500 nm são capturados pela via dependente de caveolina (REJMAN et al., 2004), diferente dos nanossistemas na escala micro ($>1\ \mu\text{m}$), os quais são internalizados por fagocitose e macropinocitose. Ademais, a literatura relata que nanossistemas catiônicos são capturados de forma mais efetiva quando comparado com nanodispositivos aniônicos. A interação eletrostática entre os nanossistemas catiônicos e a membrana plasmática aniônica dos macrófagos explica a maior captura (YEZHELYEV et al., 2008). Os autores também citam que os nanossistemas que apresentam uma superfície hidrofóbica possuem uma maior afinidade pela membrana plasmática dos macrófagos, o que acarreta consequentemente em uma maior taxa de captura (MOSAIAB et al., 2019).

Figura 4. Classificação da endocitose encontrada em todas as células animais, tendo como base as proteínas responsáveis pela internalização de partículas e solutos.



Fonte: (SAHAY; ALAKHOVA; KABANOV, 2010)

A via mais estudada em relação à endocitose de materiais é a via dependente de clatrina, porém, outras vias estão envolvidas com a internalização de materiais (figura 4), como as vias independentes de clatrina, por exemplo, as quais são classificadas da seguinte forma: 1) endocitose dependente de caveolina, 2) endocitose independente de clatrina e caveolina e 3) macropinocitose (SAHAY; ALAKHOVA; KABANOV, 2010). Desta forma, estas vias podem ser descritas como segue.

A via dependente de clatrina é utilizada por todas as células eucarióticas, a qual permite a internalização de materiais para dentro da célula utilizando vesículas revestidas por clatrina, sendo capaz de realizar a internalização de uma vasta gama de materiais. A formação das vesículas é composta por 5 fases: iniciação, seleção do material a ser capturado, montagem das proteínas, cisão e desmonte das proteínas. Assim como a clatrina, as demais proteínas que participam da formação das vesículas estão presentes no citoplasma, as quais são recrutadas para o local de formação da vesícula. Após a formação desta, as proteínas são recicladas de volta para o citoplasma e são reutilizadas na formação de outras vesículas. Entre as muitas funções desta via, podemos citar: regular a expressão de proteínas presentes

na superfície das células, internalizar nutrientes, controlar a ativação das vias de sinalização celular e conduzir o material internalizado para degradação nos lisossomos, com posterior redução do pH (MCMAHON; BOUCROT 2011).

Por outro lado, a endocitose mediada por caveolina é a via de endocitose não dependente de clatrina mais comumente citada. As caveolas são pequenos domínios de membrana hidrofóbica, ricos em colesterol e glicosfingolipídios, os quais estão associadas com a proteína chamada caveolina (HARRIS et al., 2002). Os materiais que são internalizados por esta via são direcionados para o complexo de golgi e não para os lisossomos, uma vez que esta rota não apresenta características digestivas (FERRARI et al., 2003).

Para entender a via endocítica independente de clatrina, deve-se levar em consideração a rigidez da membrana plasmática (MP), promovida pela interação entre fibras de actina e a própria MP (BRAUNGER et al., 2014). Este tipo de interação é importante uma vez que suporta a tensão causada pela pressão hidrostática intracelular (DIZ-MUÑOZ; FLETCHER; WEINER, 2013). Porém, para que aconteça a endocitose de materiais extracelulares, deve existir um equilíbrio entre a formação da membrana plasmática e os rearranjos do citoesqueleto (DE CURTIS; MELDOLESI, 2012). Assim, membros da família Rho (GTPases) são reguladores importantes, uma vez que controlam a polimerização da actina, o que confere rigidez à membrana, bem como controla a invaginação da MP, permitindo o tráfego transmembrana (BRETOU et al., 2014). Doherty e colaboradores (2011a; 2011b) citam que as GTPases são coordenadas por seus respectivos reguladores (GRAF1), de forma que células sem GRAF1 mostraram remodelação da actina e redução dos níveis de endocitose. Além de comandar a atividade das GTPases, o GRAF é um importante regulador responsável pelo controle da endocitose independente de clatrina, a qual pode ser induzida por vários caminhos, como a ligação de moléculas na superfície celular (UTSKARPEN et al., et al. 2010), liberação de esfingomielinase após dano causado na membrana celular ou a simples inserção de lipídios que afetam a curvatura da membrana.

Outra via de suma importância na endocitose de materiais pelas células eucarióticas é a macropinocitose, a qual refere-se à formação de grandes vesículas endocíticas, denominada macropinosomos (SWANSON; WATTS 1995). A formação destas macrovesículas deve-se à participação ativa da actina, causada pela invaginação da membrana plasmática. Por produzir vesículas grandes, a

macropinocitose é uma efetiva rota de endocitose não seletiva de macromoléculas insolúveis. Após a internalização nos macrófagos, os macropinosomos passam por um processo de maturação com consequente acidificação e fusão com os lisossomos (MEIER et al., 2002).

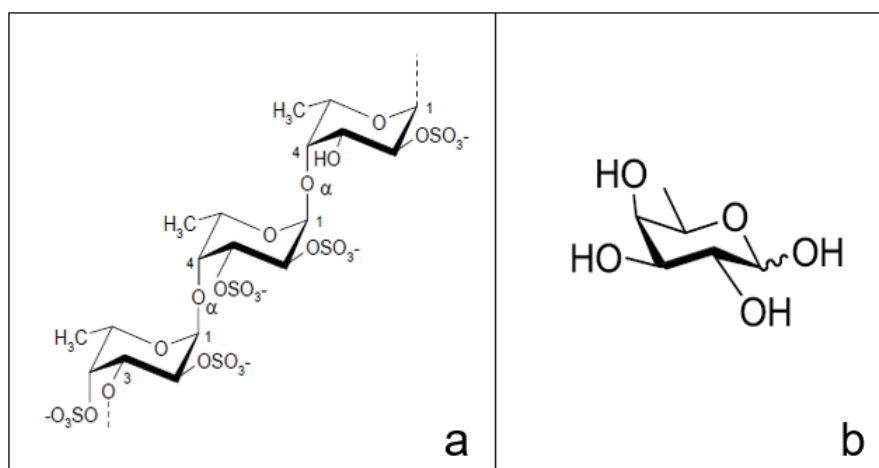
Diante dos vastos caminhos possíveis no desenho dos nanossistemas, a inserção de moléculas sinalizadoras na superfície dos mesmos favorece uma maior captura por parte dos macrófagos, visto que estas moléculas sinalizadores presentes nos nanossistemas são reconhecidos por receptores específicos presentes na membrana plasmática dos macrófagos, denominados de “receptores reconhecedores de padrões” (WIJAGKANALAN et al., 2011), o qual estão envolvidos no reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (*Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs)*). Estes receptores específicos são o manosil, fucosil, *scavenger* e Fc (fragmento cristalizável) (SINGODIA et al., 2012;), de forma que a presença de resíduos de fucose e manose na parte distal dos polissacarídeos ou glicoproteínas presentes na membrana dos nanossistemas permite o direcionamento para os macrófagos (ZHANG; MA; SUN, 2010).

2.5.2 Fucana: um ligante sítio-específico em potencial

A fucana é um polissacarídeo sulfatado encontrado em fontes naturais, como as algas marrons, os pepinos do mar e ouriços do mar, sendo as algas marrons a fonte mais comumente utilizada como forma de obtenção. Para que esta fique biodisponível a partir das suas fontes naturais e assim possa desempenhar suas funções biológicas, é necessário realizar o processo de extração, visto que a fucana faz parte da parede celular das algas marrons (FLÓREZ-FERNÁNDEZ et al., 2018) e da parede do corpo dos ouriços do mar (VILELA-SILVA et al., 2002) e dos pepinos do mar (RIBEIRO et al., 1994). O primeiro relato da extração e utilização da fucana (figura 5) foi realizado por Kylin, em 1913, quando o autor apresentou a obtenção deste polissacarídeo sulfatado a partir de uma solução ácida das espécies de algas marrons *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus*, *Laminaria digitata* e *Laminaria saccharina* (KYLIN, 1913). Com o passar dos anos vários esforços foram realizados, visando o desenvolvimento de técnicas com alta eficiência, baixo custo, realizada de forma rápida e sem promover dano ao meio ambiente, quando comparadas às técnicas convencionais. Assim, são citadas como caminhos mais viáveis para a

obtenção da fucana a extração supercrítica, a extração assistida por micro-ondas (CAMEL, 2000), extração assistida por ultrassom (CHEMAT et al., 2017) a extração assistida por enzimas (ADALBJÖRNSSON; JÓNSDÓTTIR, 2015) e a extração por líquido pressurizado (SARAVANA et al, 2016). O interesse despertado por este polissacarídeo sulfatado deve-se à sua diversidade de características biológicas. Inúmeros trabalhos descrevem as mais variadas atividades biológicas da fucana como a atividade anticoagulante (MOURÃO, 2004), antioxidante (DE SOUZA, 2007) antiangiogênica (OLIVEIRA, 2019) antitumoral (ZHURISHKINA, 2020,) bem como seus efeitos protetores sobre o trato digestório (LIN, 2013). Além disso, sua baixa toxicidade (CUNHA; GRENHA, 2016) torna-a um composto bastante atrativo e com potencial utilização na terapêutica e diagnóstico.

Figura 5. Estrutura química da fucana (a) e do monossacarídeo fucose (b).



Fonte: CUMASHI et al., 2007; LIN et al, 2013.

Arelada às múltiplas atividades biológicas da fucana, vários trabalhos vêm mostrando a importância da fucana como molécula sinalizadora para terapias sítio-específicas, permitindo que os nanossistemas sejam direcionados para tecidos e órgãos específicos do organismo, local onde o fármaco pode ser liberado e desta forma desempenhar suas propriedades farmacológicas. No trabalho proposto por Lira e colaboradores (2011), após sintetizar e caracterizar nanopartículas de poliisobutilcianoacrilato revestidas com fucana através da polimerização em emulsão aniônica e através da polimerização redox em emulsão radicalar, os autores avaliaram por microscopia confocal, a captura deste nanossistema por macrófagos J774 e fibroblastos NIH-3T3 em diferentes tempos (1h, 3h e 24h). A microscopia

confocal revelou que os dois tipos celulares capturaram as nanopartículas obtidas pelos dois métodos e que a captura variou em função do tempo, de forma que a maior captura foi vista com o tempo de 24h.

Uma outra abordagem feita por Shamay e colaboradores (2016) é a utilização da fucana como ligante da P-selectina. Uma vez expressa no endotélio, a P-selectina apresenta afinidade pelas células metastáticas, de forma que facilita o deslocamento destas células pelo endotélio dos vasos sanguíneos, propiciando assim a disseminação da metástase. Sabendo que a fucana apresenta afinidade pela P-selectina, os autores desenvolveram nanopartículas recobertas com fucana para a entrega seletiva de quimioterapêuticos nos tecidos tumorais os quais expressam a P-selectina. Os resultados também mostram que a radiação favoreceu a expressão desta molécula em tecidos tumorais os quais não expressavam esta molécula antes, facilitando assim o direcionamento do nanossistema recoberto com a fucana.

Levando em consideração que os macrófagos expressam *macrophages scavenger receptors* (MSR) e este receptor por sua vez apresenta a capacidade de reconhecer a fucose, monossacarídeo presente na estrutura química da fucana, bem como interagir com a carga negativa dos grupamentos sulfato também presentes na fucana (SHAMAY et al., 2016), os MSR podem ser utilizados como sítio de interação alvo para a fucana, uma vez que este polissacarídeo apresenta características de sítio-especificidade em potencial, permitindo o direcionamento dos nanossistemas para os macrófagos infectados.

Assim, utilizar lipossomas revestidos com fucana como ferramenta na veiculação do AU pode ser uma estratégia para reduzir a sobrevivência das cepas do *M. tuberculosis* residentes em macrófagos J774, visando a obtenção futura de uma formulação com propriedades antimicobacteriana e físico-químicas adequadas para o tratamento da tuberculose.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a atividade antimicobacteriana do ácido úsnico encapsulado em lipossomas sítio-específicos revestidos com fucana, frente a macrófagos infectados com *M. tuberculosis*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Complementar a caracterização da fucana livre e hidrofobizada extraída da *Fucus vesiculosus*, utilizando técnicas diferentes daquelas empregadas nos trabalhos tidos como base para a continuação da presente dissertação;

- Avaliar a captura celular dos lipossomas revestidos com fucana por macrófagos J774;

- Avaliar as vias de endocitose celular das formulações lipossomais revestidas com fucana;

- Determinar a ação antimicobacteriana do ácido úsnico nanoencapsulado em lipossomas revestidos com fucana frente a macrófagos infectados pelo *M. tuberculosis*.

4 METODOLOGIA

4.1 EXTRAÇÃO DA FUCANA, PURIFICAÇÃO E CONJUGAÇÃO COM O COLESTEROL

4.1.1 Extração da fucana

A fucana foi obtida a partir da *Fucus vesiculosus*, onde esta foi triturada e armazenada em recipiente, a temperatura ambiente até sua utilização. Para a realização da extração da fucana, foi utilizado o método descrito por Carvalho (2015) e Lira (2009a) *shaker*, onde primeiramente o etanol 85% (v/v) foi utilizado a 23°C (2 x 12h) e a 70°C (2 x 5h) para extrair os pigmentos e proteínas da alga marrom triturada. Logo em seguida, o etanol foi removido por filtração simples e a alga residual foi tratada com CaCl₂ 2% (m/v) a 70°C (3 x 3h) a fim de precipitar o alginato, extrair a laminarina e a fucana passando logo em seguida por uma nova etapa de filtração simples, a fim de remover a alga residual. Para a extração da fucana a partir da alga residual, foi utilizado HCl 0,01 M, pH 2, a 70°C (3 x 3h). Logo em seguida, foi realizada uma centrifugação (1500 rpm, durante 20min), a fim de remover possíveis impurezas presentes na solução da fucana após o processo de extração. A purificação da fucana foi realizada através de diálise (membrana de diálise VISKASE® *Membra Cel® Dialysis Membranes*, com 44 mm de diâmetro plano, 20µ de espessura e poros de 14KDa) durante 48h. As amostras foram liofilizadas e mantidas a temperatura ambiente em um dessecador até o seu uso.

4.1.2 Hidrólise da fucana

Visando a obtenção de frações de menor peso molecular, foi preparada uma solução de fucana na concentração de 20 mg/mL. Em seguida, o pH foi ajustado para 2,5 usando uma solução de HCl 0,1M. O sistema foi aquecido em banho termostaticado a 60°C permanecendo sob agitação constante durante 40min. Finalmente, o pH foi neutralizado utilizando uma solução de NaOH 0,1M. As amostras foram liofilizadas e mantidas a temperatura ambiente em um dessecador até sua utilização (SIVAKUMAR, 2003; CARVALHO, 2015)

4.1.3 Síntese do colesteroil-fucana

Para a realização da síntese a fim de realizar a conjugação da fucana com o colesterol, primeiramente foi obtido o carbamato de colesteroil em método descrito por Carvalho (2015). O colesterol (0,936g; 2,4mmol), diisocinato de hexametileno (0,8112g; 4,8mmol) e o diazobencilo (DABCO) (0,0168g; 0,14mmol) foram adicionados em tolueno seco (12ml) e o radical obtido utilizando o ultrassom, a 100°C, 120W, durante 20min. Logo após foi adicionado éter de petróleo (50ml) e o sistema acondicionado a 4°C, durante 24h. A retirada do éter de petróleo bem como do tolueno foi realizada utilizando filtração simples seguido de remoção no rotaevaporador. O material foi acondicionado em dessecador à vácuo até sua utilização.

Para a obtenção do colesteroil-fucana, o carbamato de colesteroil (50mg; 90,1µmol), a fucana hidrolisada (321mg; 10,7µmol) e o DABCO (3mg; 26,7µmol) foram adicionado em DMSO seco (10ml). Todo o sistema foi submetido a ultrassom, a 100°C, 120W, durante 50min. Após o tempo de reação, foi adicionado 50ml de etanol e o sistema foi novamente armazenado a 4°C até durante 24h. O precipitado obtido foi separado e purificado por diálise, durante 48h, sendo logo após liofilizado e armazenado em dessecador a vácuo até seu uso (SIVAKUMAR, 2003; CARVALHO, 2015).

Para caracterização, o material foi submetido à espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, adotando os seguintes parâmetros: faixa de medição entre 400-4000cm⁻¹, resolução 4cm⁻¹ utilizando 32 scans. Para a calorimetria diferencial de varredura (DSC), foi adotada uma atmosfera de N₂, com faixa de temperatura de análise compreendida entre 25°C e 600°C para o DSC, com taxa de aquecimento de 10°C/min. Foram realizados ensaios de espectroscopia de raios-X por energia dispersiva a fim de avaliar a concentração de enxofre na fucana livre e na fucana hidrofobizada (SIVAKUMAR, 2003; WU, 2014; CARVALHO, 2015).

4.2 OBTENÇÃO DA FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL SÍTIO-ESPECÍFICA CONTENDO ÁCIDO ÚSNICO

Os lipossomas foram preparados pelo método da hidratação do filme lipídico seguido de sonicação (LIRA et al, 2009b). Para a obtenção dos lipossomas (Lipo; AU-Lipo; Lipo-Fuc₅; Lipo-Fuc₁₀; AU-Lipo-Fuc₅; AU-Lipo-Fuc₁₀) primeiramente os componentes da fase orgânica (fosfatidilcolina de soja, colesterol e estearilamina) foram pesados na proporção de 8:1:1, para uma concentração total de 80 mM. Para a obtenção de lipossomas contendo ácido úsnico (AU-Lipo; AU-Lipo-Fuc₅; AU-Lipo-Fuc₁₀), o AU foi adicionado para uma concentração final de 5,80 mM (2 mg/mL). Os componentes da fase orgânica das diferentes formulações foram solubilizados em uma solução de clorofórmio/metanol (3:1) sob agitação magnética. Para a obtenção de lipossomas fluorescentes, foi adicionado à fase orgânica 125 µL de uma solução de rodamina (2 mg/mL) em metanol. Os solventes foram removidos utilizando rotaevaporador a 37°C, 80 rpm. Após a formação do filme lipídico, foram adicionados 10 mL de tampão fosfato (pH 7,4) como fase aquosa, obtendo desta forma lipossomas multilamelares. Para o preparo de lipossomas revestidos com fucana (Lipo-Fuc₅; Lipo-Fuc₁₀; AU-Lipo-Fuc₅; AU-Lipo-Fuc₁₀), o filme lipídico foi hidratado utilizando uma solução de colesteroil-fucana (0,5 mg/mL ou 1 mg/mL) em tampão fosfato pH 7,4 de forma que a proporção lipídeo/ligante foi de 114:1 (p/p) (CARVALHO, 2015). As formulações sem fucana (Lipo; AU-Lipo) foram sonicados a 200 W, 40 Hz, durante 300 s. Já para os lipossomas revestidos com fucana, foi adotado o tempo de 900s de sonicação, visando obter um tamanho de vesícula o mais próximo possível das formulações sem revestimento. A fim de padronizar o tamanho e o índice de polidispersão, as formulações sem revestimento e com revestimento foram passadas na extrusora. Para tanto, foram utilizados poros de diferentes tamanhos (3 µm e 600 nm; 5 ciclos em cada membrana) a uma pressão de 100 psi. As formulações foram caracterizadas pelo diâmetro hidrodinâmico (TP em nm), índice de polidispersão (PDI), carga superficial (ζ em mV) e pH. O índice de polidispersão e o diâmetro das vesículas foram analisadas utilizando a espectroscopia de correlação de fótons. As análises das formulações lipossomais foram realizadas a 25 °C em triplicata, utilizando uma diluição de 5:100 em água ultrapura (Malvern Zetasizer Nano ZS90, Malvern Instruments, Worcestershire, UK) (CARVALHO, 2015).

4.3 DOSEAMENTO DO ÁCIDO ÚSNICO E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO EM LIPOSSOMAS

Para a realização do doseamento do ácido úsnico nos lipossomas, 40 µL da formulação lipossomal foi transferido para um balão de 5 mL e o volume foi completado/preenchido com metanol. O sistema foi homogeneizado em vórtex (10 s) e a quantificação do AU foi realizada por leitura de absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 280 nm. As leituras foram realizadas em triplicata.

Para a realização da eficiência de encapsulação (EE%) de AU nos lipossomas, uma alíquota de 400 µL das formulações lipossomais foi transferido para uma unidade filtrante, sendo posteriormente centrifugada durante 1h, a 9000 rpm, a fim de remover o AU não encapsulado. Uma alíquota de 40 µL do AU não encapsulado foi diluído em metanol qsp 1mL, homogeneizado em vórtex (10 s) e posteriormente a quantificação do AU foi realizada por leitura de absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 280 nm. As leituras foram realizadas em triplicata (LIRA et al., 2009b).

4.4 ESTUDO DE VISUALIZAÇÃO MICROSCÓPICA DE INTERNALIZAÇÃO CELULAR DOS LIPOSSOMAS EM MACRÓFAGOS J774

Primeiramente, lamínulas circulares de vidro foram acondicionadas em cada poço de uma placa de 24 poços. Em seguida, os macrófagos J774 foram adicionadas (1×10^4 células/poço) e incubados por 24 h a 37 °C e 5% CO₂. Após crescimento das células na lamínula, 50 µL das formulações lipossomais (Lipo, Lipo-Fuc₅ e Lipo-Fuc₁₀) foram adicionados e a placa foi incubada por 1 h e 3 h. O meio foi então retirado, as células lavadas com PBS e fixadas com 500 µL paraformaldeído a 4%. Após 20 minutos, os poços foram lavados 3 vezes com PBS e 500 µL de cloreto de amônio a 50 mM foram adicionados para bloquear a atividade do paraformaldeído. Após 10 minutos, as células foram lavadas novamente com PBS, cuidadosamente removidas dos poços e transferidas para lâminas contendo DAPI *blue*. As lamínulas foram então seladas e armazenadas sob proteção da luz até o momento das leituras. As imagens foram obtidas em microscópio óptico de fluorescência (AXIO Imager M2m, Zeiss, Germany) no Laboratório de Microscopia

Eletrônica do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) na Universidade Federal de Pernambuco (LU et al., 2017).

4.5 AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE ENDOCITOSE

Para avaliar o mecanismo de endocitose dos lipossomas quatro inibidores farmacológicos de diferentes vias de endocitose foram utilizados: sacarose (0,45 M), genisteína (200 μ M), citocalasina D (40 μ M) e nocodazol (10 μ M), que são inibidores das vias Clatrina, Caveolina, Macropinocitose e independente de clatrina, respectivamente.

Primeiramente, macrófagos J774 foram cultivados em placas de 24 poços, na concentração de 1×10^5 células/poço e incubadas a 37 °C, 5% de CO₂ durante 24h. Em seguida, o meio de cultura foi retirado e cada inibidor, diluído em novo meio, foi adicionado aos poços, utilizando 200 μ L de cada inibidor, e o sistema incubado por 30 minutos a 37 °C e 5% CO₂. Posteriormente, 25 μ L das formulações Lipo, Lipo-Fuc₅ e Lipo-Fuc₁₀ foram adicionados aos poços e as placas incubadas por mais 1 hora a 37 °C e 5% de CO₂. Ao final, todo material foi removido, as células lavadas com meio de cultura (RPMI) e 200 μ L de PBS adicionado. As células foram então soltas das placas e transferidas para microtubos para leitura em citometria de fluxo (MoFlo XDP, Beckman-Coulter). As análises foram realizadas em duplicata a partir da contagem de 7.000 células/gate. Cada formulação sem a presença do inibidor foi considerada como controle positivo e a intensidade de fluorescência foi expressa como 100% (MONTI, 2015).

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA FRENTE A MACRÓFAGOS INFECTADOS COM *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* H37RA

4.6.1 Microrganismo

A cepa *M. tuberculosis* H37Ra (ATCC 25177) foi utilizada neste estudo como cepa de referência da *American Type Culture Collection*, classificada como sensível a todos os fármacos de primeira linha.

4.6.2 Preparo do inóculo

A cepa *M. tuberculosis* H37Ra foi reativada em meio Löwenstein-Jensen (LJ) (Himedia) a 37 °C por 21 dias para atingir sua fase exponencial de crescimento. Posteriormente, as colônias foram incubadas em caldo Middlebrook 7H9 (Sigma Aldrich) suplementado com 10% ácido oleico, albumina bovina, dextrose, catalase (OADC, BBL/Becton-Dickinson), 0,2% de glicerol e 0,05% de Tween 80; e incubadas a 37 °C por 7 a 10 dias. Em seguida o sobrenadante foi ajustado através do espectrofotômetro $DO_{600} \approx 0,8-1$ do inóculo que corresponde a concentração do inóculo no nível 1 da escala de McFarland (3×10^8). Em seguida foram realizadas diluições em DMEM necessárias para obter uma razão de infecção de 10 bactérias/macrófagos (BRASIL, 2008; LUO, 2013).

4.6.3 Infecção dos macrófagos

Macrófago J774 foram cultivados em placas de 96 poços (1×10^4 células/poço) e incubados a 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂ durante 48h, garantindo a confluência dos macrófagos na placa. Os macrófagos foram infectados com bacilos suspensos em meio DMEM, em multiplicador de infecção (MOI) de 10 por 4 horas, a 37 °C a 5% de CO₂. Após o período de infecção, as células foram lavadas três vezes com meio DMEM a fim de retirar as bactérias livres no meio, ou seja, aquelas que não foram fagocitadas pelos macrófagos.

4.6.4 Tratamento

O tratamento foi realizado logo após a infecção utilizando a rifampicina (RIF) e etambutol (EMB) como fármacos de referência, na concentração de 4 µg/mL e 16 µg/mL, respectivamente. Essas concentrações foram escolhidas de acordo com o Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias (BRASIL, 2008). O ácido úsnico foi testado em sua forma livre e em sua forma encapsulada (AU-Lipo-Fuc₅) na concentração de 3,42 µg/mL. Esta concentração foi escolhida uma vez que apresentou citotoxicidade de acordo com o trabalho de Lira e colaboradores (2009) (IC_{50} : $12,5 \pm 0,26$ µg/ml) e está acima da concentração mínima inibitória (MIC: 0,98 µg/ml), de acordo com o trabalho de Ferraz e colaboradores

(2016). Macrófagos infectados sem tratamento foram usados como controle positivo. Após o tratamento as placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Após incubação, as células foram lavadas com solução salina e lisadas com dodecilsulfato de sódio a 0,025% para remoção das bactérias dentro das células. Foi realizada uma diluição seriada em PBS e Tween 0,05% estéril com fator de diluição de 10 e plaqueado em meio LJ (JAHAGIRDAR et al., 2020).

As placas foram observadas semanalmente, até visualização de crescimento bacteriano. Após o período de crescimento, as unidades formadoras de colônia foram contadas e o resultado expresso da seguinte forma: + (0 a 5 UFC); ++ (6 a 10 UFC); +++ (11 a 15 UFC); ++++ (16 a 20 UFC) e +++++ (> 20 UFC) (BRASIL, 2008).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA FUCANA E DO COLESTEROIL-FUCANA

A fucana foi extraída e o FTIR revelou absorção em bandas características para a Fuc e Fuc-hidrofobizada ($3353\text{ cm}^{-1}(\text{OH})$; $1598\text{ cm}^{-1}(\text{C}=\text{O})$; $1230\text{ cm}^{-1}(\text{O}=\text{S}=\text{O})$; $819\text{ cm}^{-1}(\text{C}-\text{O}-\text{S})$); (figura 7A e 7B), assim como para o colesterol ($3340\text{ cm}^{-1}(\text{NH})$; $1137\text{ cm}^{-1}(\text{OCO})$; $1688\text{ cm}^{-1}(\text{C}=\text{O})$) (figura 6A) e para o radical do colesterol ($3340\text{ cm}^{-1}(\text{NH})$; $2256\text{ cm}^{-1}(\text{NC}=\text{O})$; $1137\text{ cm}^{-1}(\text{OCO})$; $1688\text{ cm}^{-1}(\text{C}=\text{O})$) (figura 6B). Como relatado por Sivakumar (2003), na obtenção da pulalana conjugada ao colesterol, na primeira etapa da reação, os grupamentos hidroxila do colesterol reagem com o grupo $\text{NC}=\text{O}$ do diisocianato de hexametileno, formando o N-(6 isocianato-hexil) carnabato (derivado do colesterol). Na segunda etapa da reação, a formação do colesteroil-pulalana ocorre quando os grupos $\text{NC}=\text{O}$ do derivado do colesterol reagem com os grupamentos hidroxila da pulalana. O mesmo princípio é observado na reação de conjugação da fucana com o colesterol, quando o grupo $\text{NC}=\text{O}$ do radical de colesterol reagem com as hidroxilas livres da fucana, levando à obtenção do colesteroil-fucana. Nos resultados do FTIR, a redução da absorbância no pico $3353\text{ cm}^{-1}(\text{OH})$ da fuc-hidrofobizada e a ausência do pico 2256 cm^{-1} referente ao grupo $(\text{NC}=\text{O})$ para o colesteroil, indicam que os grupamentos livres $\text{NC}=\text{O}$ do radical do colesterol (figura 6B) reagiram com os grupos OH da fucana, obtendo o colesteroil-fucana (fuc-hidrof) (figura 7B). Assim, estes resultados corroboram o trabalho de Sivakumar (2003), quando os autores realizaram a conjugação da pulalana com o colesterol, obtendo o colesteroil-pulalana.

Figura 6. FTIR do colesterol e do radical de colesterol (colesteroil). Pico do grupamento NC=O evidenciado em 2256 cm^{-1} .

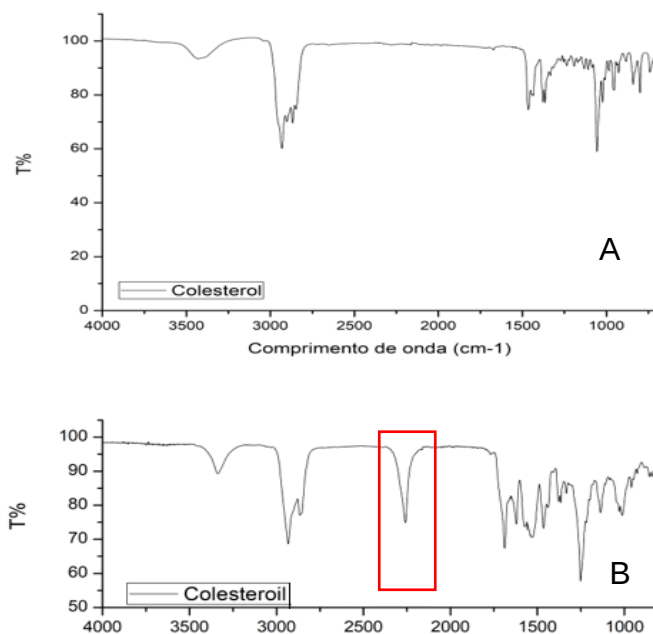
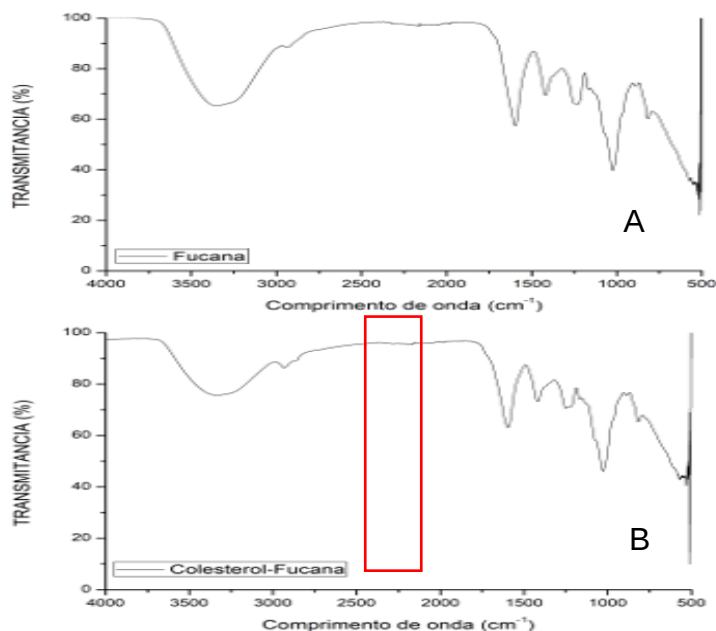


Figura 7. FTIR da fucana e da fucana hidrofobizada (colesteroil-fucana).



As análises de espectroscopia de raio-X por energia dispersiva (EDX) indicaram a presença de 20,94% de enxofre na fucana livre e 22,19% de enxofre na fucana hidrofobizada (figura 8). Já analisando o espectro, o pico aparecendo entre 2

e 3 keV é característico para o elemento enxofre, o qual aparece na leitura da fucana livre e na leitura da fucana hidrofobizada. Resultados semelhantes foram encontrados por FERNANDES-NEGREIROS (2018) ao analisar nanopartículas de pratas recobertas com polissacarídeos sulfatados.

Figura 8. Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDX). Espectro da fucana livre (a) e da fucana hidrofobizada (b).

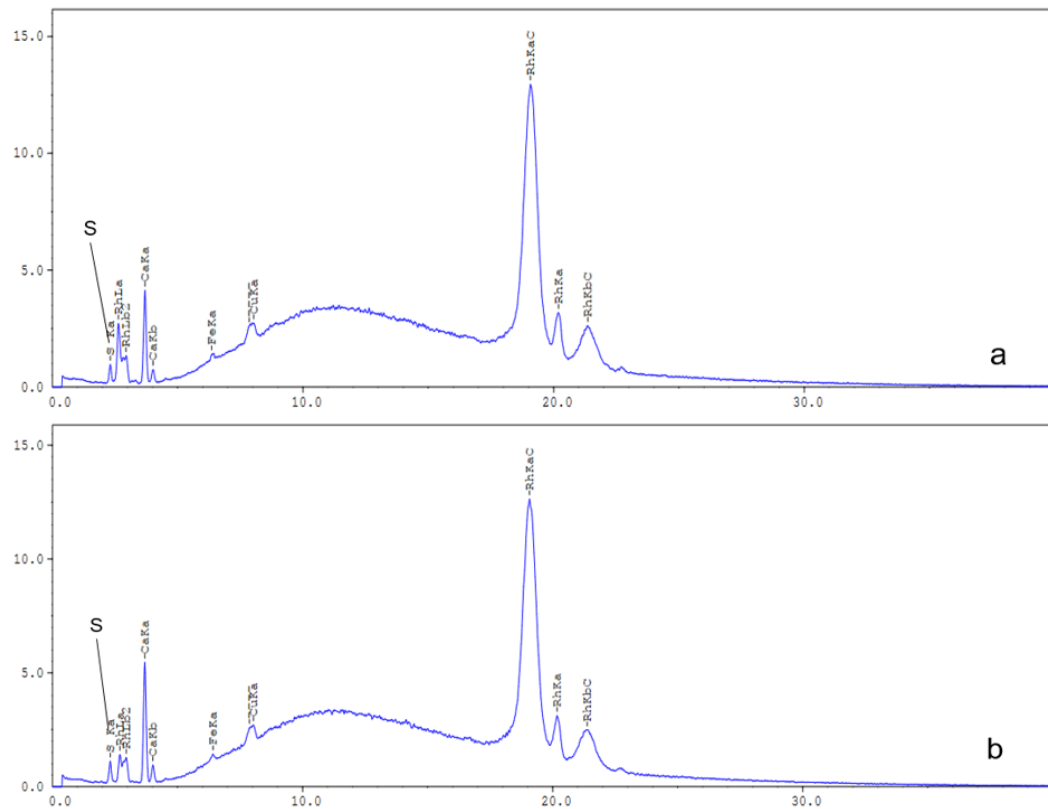
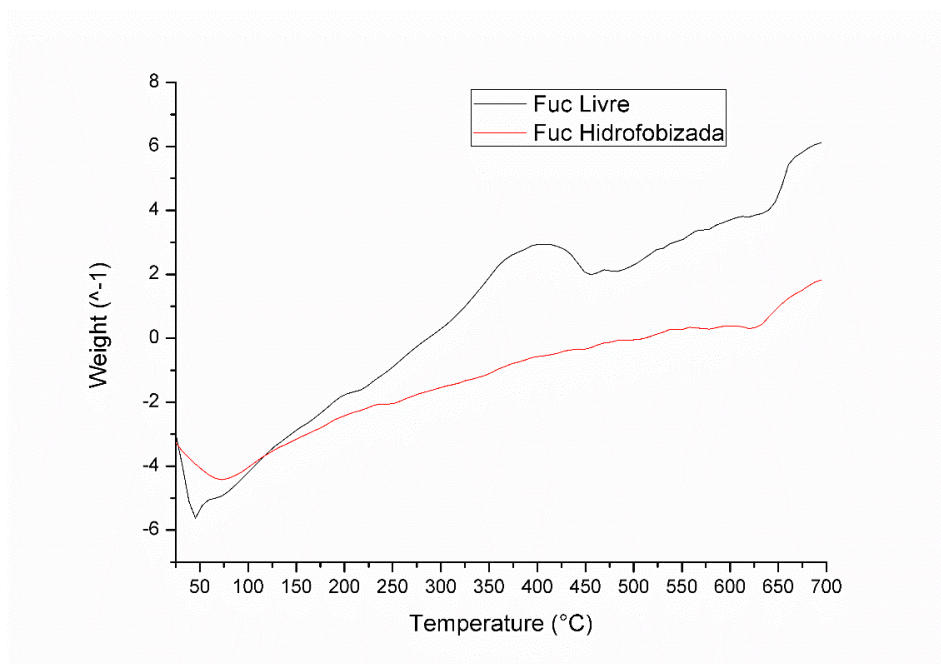


Figura 9: DSC da Fuc e Fuc Hidrofobizada.



A curva de DSC apresentou 3 estágios durante as análises (figura 9), onde o primeiro estágio está basicamente associado com a perda de água a 25 °C. Em seguida, é possível observar as reações de pirólise iniciando a partir de 120 °C. O segundo estágio, correspondente à desvolatilização da amostra com início a partir de 300 °C, mantendo-se até 450 °C. Finalmente, o terceiro estágio de degradação da molécula com início a partir de 500 °C. Resultados similares foram obtidos por Rodriguez-Jasso e colaboradores (2011), de fucana extraída a partir da *Fucus vesiculosus*. Os autores citam que a massa residual é provavelmente constituída por sulfatos, fosfatos e carbonatos, os quais são minerais encontrados em polissacarídeos como a fucana.

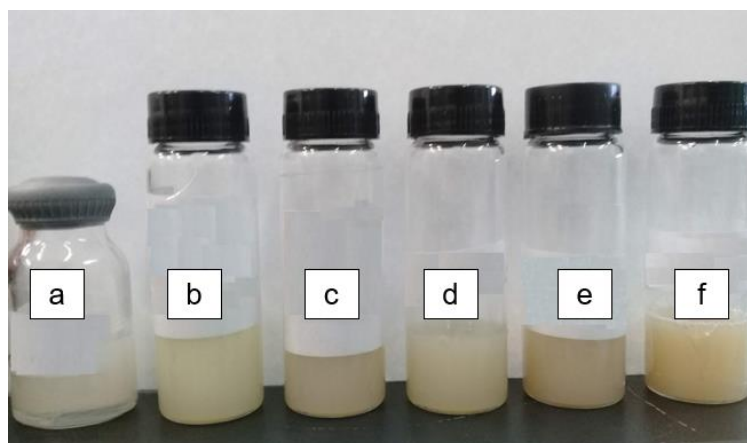
5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES

A utilização de nanocarreadores com a superfície modificada vem sendo alvo de muitas pesquisas e está amplamente descrita na literatura (MOSAIAB, 2019). Muitos são os tipos de ligantes utilizados na superfície dos nanossistemas, entre eles peptídeos, anticorpos, proteínas, glicolipídios, lectinas e polissacarídeos (TORCHILIN, 2009; BERTRAND, 2014). Dentre os polissacarídeos, a fucana vem apresentando destaque. A fucana é um polissacarídeo sulfatado extraído de algas

marrons *Fucus vesiculosus* (USOV, 2009; POMIN, 2012). Assim, o objetivo deste trabalho foi utilizar lipossomas revestidos com fucana sítio-específicos para macrófagos, uma vez que estas células expressam receptores, como por exemplo, receptores captadores de espécies reativas de oxigênio (*macrophage scavenger receptors*), capazes de reconhecer o monossacarídeo fucose (KIM; ORDIJA; FREEMAN, 2003), bem como os grupos sulfato, ambos presentes na estrutura química da fucana.

Inicialmente, foram preparados os lipossomas sem revestimento (Lipo) contendo ou não ácido úsnico onde foram utilizados fosfatidilcolina, colesterol e estearilamina, na proporção de 8:1:1, com concentração final de lipídios de 80 mM. Quando utilizado ácido úsnico, a concentração final deste fármaco na formulação foi de 5,8 mM (2 mg/mL). Em seguida, para a obtenção de lipossomas revestidos, utilizamos a fucana em diferentes concentrações (0,5 mg/mL e 1 mg/mL) a fim de obter lipossomas sítio-específicos para macrófagos (figura 10).

Figura 10. Lipossomas contendo ou não ácido úsnico revestidos ou não com fucana: a: Lipo; b: AU-Lipo; c: Lipo-Fuc₅; d: Lipo-Fuc₁₀; e: AU-Lipo-Fuc₅; f: AU-Lipo-Fuc₁₀.



De acordo com a tabela 3, houve um aumento no tamanho das vesículas de acordo com o aumento na concentração de fucana, bem como uma redução no potencial zeta ($+49,53 \pm 2,4$ mV para $+4,36 \pm 0,17$ mV), uma vez que a fucana possui carga negativa devido à presença dos grupamentos sulfato em sua estrutura química (USOV, 2009; POMIN, 2012). Vale salientar que a redução do potencial zeta e o alto PDI do AU-Lipo-Fuc₅ e AU-Lipo-Fuc₁₀ em relação às respectivas

formulações sem ácido úsnico (Lipo-Fuc₅ e Lipo-Fuc₁₀) deve-se a alta concentração do AU utilizada, favorecendo a formação de dímeros de AU ou estruturas com mais de duas moléculas (*clusters*). Lira e colaboradores (2009) viram que quando em alta concentração, o AU tende a ser exprimido para fora da bicamada lipídica. Este fenômeno pode explicar a redução do potencial zeta, visto que uma das hidroxilas do AU apresenta pKa de 4,4, favorecendo o surgimento de cargas negativas na molécula em pH fisiológico (7,4). Já para o elevado PDI, a explicação é a mesma utilizada para o baixo potencial zeta, uma vez que as moléculas do AU não apresentam uma ideal acomodação entre os lipídios que formam a bicamada lipídica. O aumento no tamanho de partícula ao revestir lipossomas com polissacarídeos também foi visto em outros trabalhos, quando Vyas e colaboradores (2007), por exemplo, revestiram lipossomas (PC:CH:SA) com colesteril manana. Os pesquisadores também observaram uma redução do potencial zeta à medida que a concentração do ligante aumentava na formulação. Assim, o aumento do tamanho de partícula, bem como a redução do potencial zeta indica que a fucana está presente na superfície do nanossistema. A EE% do AU nas formulações lipossomais foi de $100\% \pm 4,95 \times 10^{-3}$; $97,75 \pm 2,12 \times 10^{-3}$ e $100\% \pm 1,41 \times 10^{-3}$ para as formulações AU-Lipo, AU-Lipo-Fuc₅ e AU-Lipo-Fuc₁₀, respectivamente. Estes resultados corroboram com os resultados de Lira e colaboradores (2009), onde os autores obtiveram uma alta razão de encapsulação do AU (96%) em lipossomas constituídos de fosfatidilcolina, colesterol e estearilamina.

Figura 11. Lipossomas não revestidos e revestidos com fucana contendo rodamina B.



Quando necessário, foi adicionado rodamina B (2 mg/ml) à fase orgânica, obtendo desta forma lipossomas contendo rodamina para ensaios de microscopia de fluorescência os quais apresentaram características físico-químicas semelhantes aos lipossomas sem rodamina (figura 11).

Tabela 3: Caracterização físico-química das formulações lipossomais.

Formulação	Tamanho de partículas (nm)	PDI	ζ (mV)	EE%
Lipo	104,8 ± 0,9	0,27	+49,53 ± 2,4	----
Lipo-Fuc₅	241,2 ± 41,08	0,619	+48,86 ± 0,9	----
Lipo-Fuc₁₀	2050,3 ± 922,16	0,92	+36,43 ± 1,5	----
AU-Lipo	120,9 ± 0,85	0,278	+31,16 ± 0,2	100% ± 4,95 x 10 ⁻³
AU-Lipo-Fuc₅	1441,6 ± 341,41	0,869	+9,13 ± 0,26	97,75% ± 2,12 x 10 ⁻³

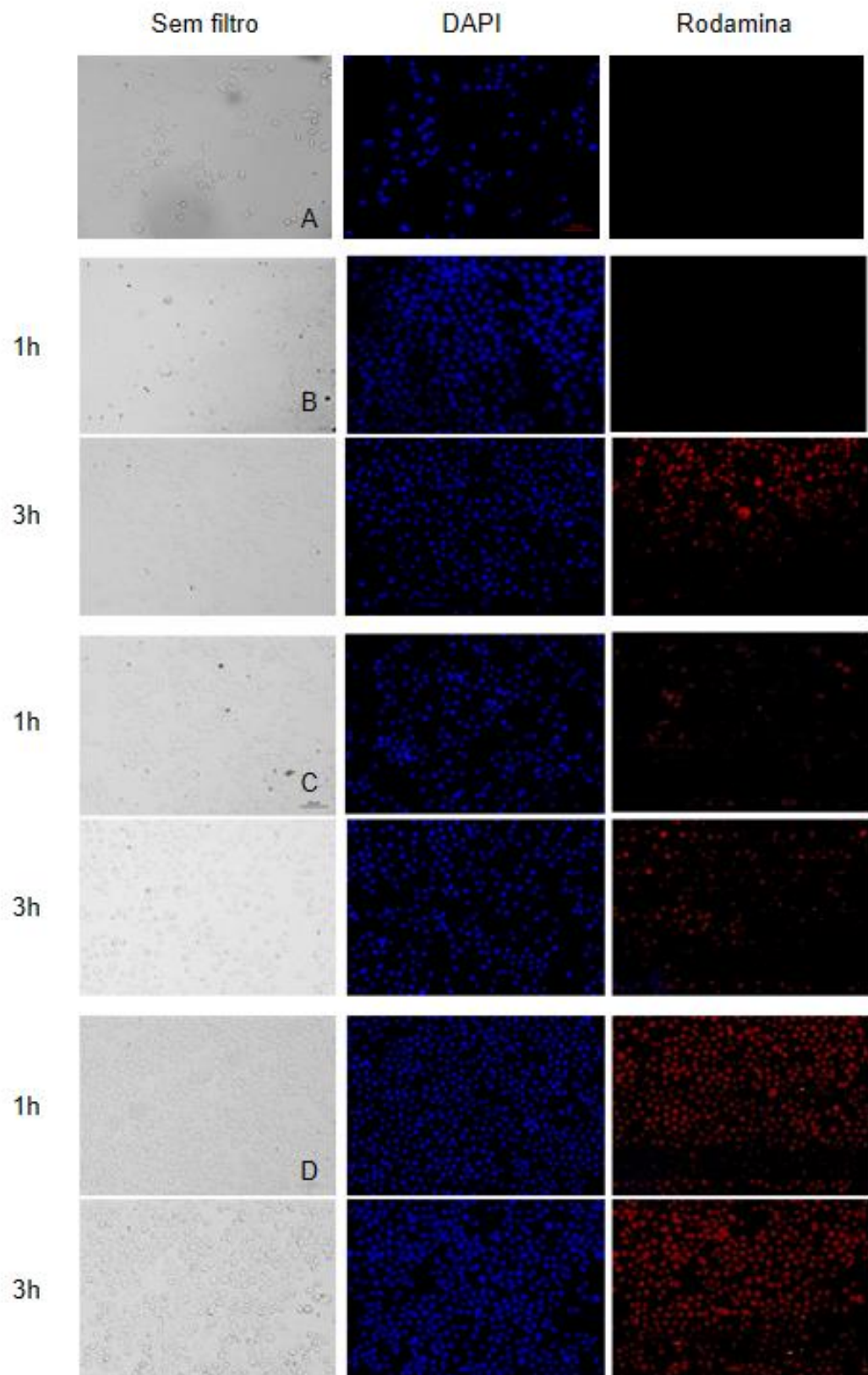
AU-Lipo-Fuc₁₀	2243,7 ± 563,02	0,179	+4,36 ± 0,17	100% ± 1,41 x 10 ⁻³
---------------------------------	-----------------	-------	--------------	--------------------------------------

5.3 ESTUDO DE VISUALIZAÇÃO MICROSCÓPICA DE INTERNALIZAÇÃO CELULAR DOS LIPOSSOMAS EM MACRÓFAGOS J774

O estudo de visualização microscópica permite evidenciar a captura dos lipossomas pelos macrófagos, provando que o sistema pode ser utilizado como ferramenta para veicular fármacos para o interior destas células, favorecendo um aumento na concentração do princípio ativo no local (BASHA, TS, DOBLE, 2019). Assim, este experimento teve como objetivo avaliar a captura dos lipossomas pelos macrófagos J774. Conforme visto na figura 12, não foi observada fluorescência após 1 hora de incubação com lipossomas sem fucana (Lipo). Por outro lado, após esse mesmo tempo de incubação, foi possível observar fluorescência após adição dos Lipo-Fuc₅ e Lipo-Fuc₁₀, indicando captura destas formulações pelos macrófagos J774. Após 3 horas de incubação todas as formulações foram capturadas pelos macrófagos, no entanto foi observada uma maior intensidade de fluorescência nas células tratadas com Lipo-Fuc₁₀.

De acordo com o trabalho de Ferraz e colaboradores (2015), a captura celular de lipossomas convencionais e lipossomas revestidos com fucana por macrófagos J77 foi avaliado em 3 tempos diferentes. Os resultados mostraram que os lipossomas revestidos com fucana apresentaram captura no menor tempo avaliado, diferente dos lipossomas convencionais que apresentaram captura apenas no maior tempo do estudo. Com isso, os resultados do presente estudo (figura 12) corroboram com o trabalho de Ferraz e colaboradores (2015) quando lipossomas revestidos com fucana (Lipo-Fuc₅ e Lipo-Fuc₁₀) foram efetivamente capturados pelos macrófagos no menor tempo de avaliação (1h), diferente dos lipossomas convencionais, quando foram capturados apenas no maior tempo de estudo (3h), revelando que os lipossomas revestidos com fucana são efetivamente reconhecidos e capturados pelos macrófagos.

Figura 12. Visualização microscópica de internalização celular dos lipossomas em macrófagos J774. Macrófagos J774 (A), Lipo (B), Lipo-Fuc₅ (C) e Lipo-Fuc₁₀ (D).



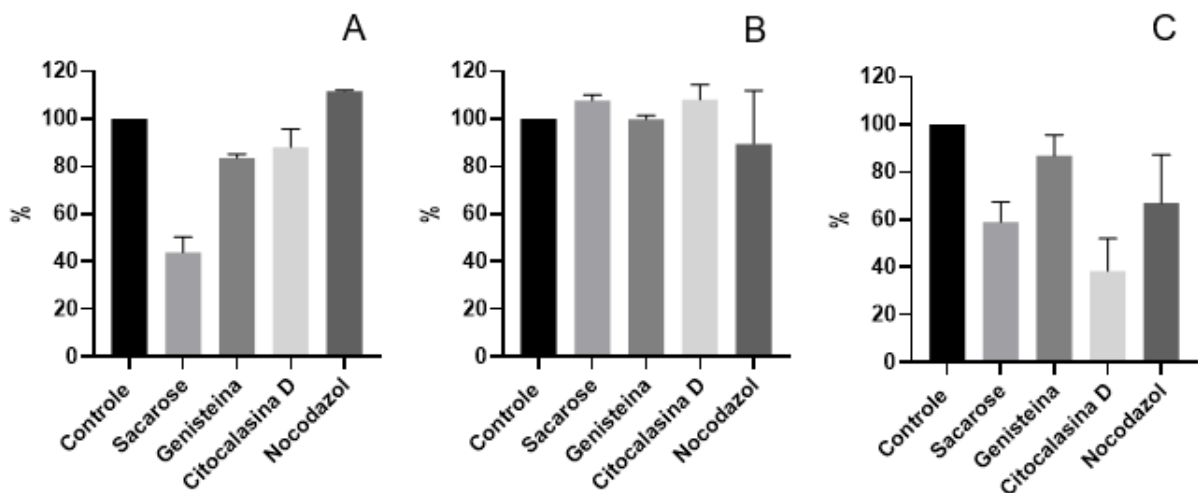
5.4 AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE ENDOCITOSE

Sabe-se que a maioria dos nanossistemas entram nas células por endocitose e deste modo o estudo do tráfego intracelular é de grande importância. Neste sentido, indo mais detalhadamente, a captura dos lipossomas (Lipo, Lipo-Fuc₅ e Lipo-Fuc₁₀) por diferentes vias foi investigada após incubar macrófagos com quatro inibidores farmacológicos diferentes, conhecidos por bloquear seletivamente as vias de endocitose.

Em relação aos lipossomas sem fucana (Lipo), foi observada uma redução da captura pelos macrófagos após incubação com a sacarose, sugerindo que o mecanismo de endocitose utilizado foi a via dependente da clatrina (figura 13). Levando em consideração as características físico-químicas dos lipossomas sem fucana o qual apresentou tamanho de partícula de $104,8 \pm 0,9$ nm e potencial zeta $+49,53 \pm 2,4$ mV, a via das clatrininas é justificada pelo fato de que todas as células eucarióticas utilizam essa via para a internalização de materiais com diâmetro menor que 200 nm (REJMAN, 2004). Huang e colaboradores (2002) avaliaram a via de endocitose de nanopartículas de quitosana por células do epitélio pulmonar A549. Os autores observaram que as partículas, as quais apresentavam diâmetro médio de $194,7 \pm 1,6$ nm, foram internalizadas predominantemente pela via dependente de clatrina. Além do tamanho, sabe-se que a carga da superfície é um fator importante na captura de nanossistemas (ARVIZO, 2011). Nanossistemas com carga positiva favorecem a endocitose celular, uma vez que as células são carregadas negativamente (YEZHELYEV, 2008). Harush-Frenkel e colaboradores (2007) estudaram o efeito da carga superficial de nanopartículas de polietilenoglicol polilático carregadas positivamente e negativamente em relação à captura por fibroblastos e por células epiteliais. Foi visto, para ambas as células, que as nanopartículas catiônicas apresentaram uma maior captura em relação às nanopartículas aniônicas (HARUSH-FRENKEL, 2007; HARUSH-FRENKEL, 2008). Desta forma, sugerimos que a carga superficial positiva do Lipo pode ter auxiliado na captura deste nanossistema pelos macrófagos J774. Além da via clatrina, observou-se também uma inibição na via caveolina (genisteína). Uma vez que a análise do tamanho de partícula a partir da espectroscopia de correlação de fótons revelou uma subpopulação de lipossomas sem revestimento com tamanho de vesícula abaixo de 100nm, a inibição da via caveolina é explicada uma vez que esta via é responsável

pela captura de materiais variando entre 60 e 80 nm (KRAJEWSKA, 2004). Szymanowski e colaboradores (2017) avaliaram a via de endocitose de lipossomas catiônicos em células do tipo epitelial descrevendo que lipossomas com diâmetro médio de 80 nm foram internalizados pela via caveolina, revelando que o tamanho das vesículas foi um fator importante na captura dos nanossistemas.

Figura 13: Quantificação por citometria de fluxo da internalização do Lipo (A), Lipo-Fuc₅ (B), e Lipo-Fuc₁₀ (C) por macrófagos J774.



Por outro lado, o Lipo-Fuc₅ parece não ter sido influenciado pela presença de nenhum dos inibidores utilizados, uma vez que não foi observada redução na intensidade da fluorescência, mostrando que nenhuma das vias estudadas foi inibida. O fato de não ser observada inibição em nenhuma das vias, não descarta a existência de captura do Lipo-Fuc₅, uma vez que os dados revelam a presença de fluorescência dentro dos macrófagos J774 analisados por citometria de fluxo. Desta forma, os resultados fazem-nos pensar que os nanossistemas podem ter sido internalizados por outras vias, especificamente aquelas independentes de clatrina e caveolina, como por exemplo: vias dependentes de Arf-6, a via dependente de flotilina, dependente de Cdc-42 e dependentes de RhoA.

A formulação lipossomal com a maior concentração de fucana (Lipo-Fuc₁₀) apresentou uma redução nas vias de endocitose dependentes de clatrina e na via macropinocitose, e estes resultados corroboram com a literatura, uma vez que estas vias estão envolvidas com a endocitose de materiais abaixo de 200 nm e materiais na escala micro, respectivamente (YEZHELYEV, 2008). Recentemente, Pi

e colaboradores (2019) estudaram o mecanismo de endocitose de nanopartículas revestidas com manose utilizados pelos macrófagos. Os autores observaram que as nanopartículas foram internalizadas tanto pela via de endocitose mediada por clatrina como macropinocitose. Sabe-se que estas duas vias são importantes, uma vez que estão envolvidas na fusão dos endossomos com lisossomos (REJMAN, 2004; KERR, 2009) e desta forma, na formação do fagolisossomo (BRIONES, 2008). O baixo pH dentro destas estruturas causada pela presença de enzimas lisossomais (WANG, 2011) favorece a degradação do nanossistema, com consequente liberação do fármaco dentro do citoplasma do macrófago, de forma que o princípio ativo pode iniciar efetivamente a eliminação do Mtb intracelular (PI, 2019). Assim, a compreensão da via endocítica é importante, uma vez que pode elucidar o caminho intracelular percorrido pelo nanossistema (KARLSON, 2013) e esta abordagem é crucial para o tratamento da tuberculose, visto que o agente causador desta epidemia é um parasita intracelular obrigatório (HAN, 2008).

Uma vez que o *M. tuberculosis* utiliza as vias aéreas para alcançar os pulmões (NARASIMHAN et al., 2013), a via inalatória parece ser uma possível via para a administração dos lipossomas sítio-específicos contendo AU. Além disso, a literatura revela que as vias oral e parenteral não fornecem níveis terapêuticos ideais dos medicamentos anti-Tb para os sítios de infecção. As limitações da via oral devem-se ao efeito de primeira passagem pelo fígado, além da baixa absorção de alguns fármacos, devido à baixa solubilidade dos mesmos (TURNER, 2011). Já a via parenteral, apesar de proporcionar uma alta biodisponibilidade e não possuir metabolismo de primeira passagem pelo fígado, é uma via bastante dolorosa, necessitando de métodos invasivos para a administração dos fármacos, reduzindo desta forma a adesão ao tratamento por parte dos pacientes (PRABAKARAN, 2004). Além desses fatores, os sítios de infecção do Mtb no pulmão, apresentam baixa vascularização e possuem uma espessa camada de tecido fibroso (granuloma), o que dificulta a penetração dos fármacos. Diante disso, o resultado de toda essa problemática é a baixa concentração dos fármacos dentro dos macrófagos, o que pode levar ao surgimento de resistência bacteriana aos medicamentos (ALI et al., 2016). Desta forma, os sistemas inalatórios que utilizam base nanotecnológica para a veiculação dos fármacos de forma específica para os pulmões a fim de reduzir os efeitos colaterais da administração sistêmica, bem como aumentar a eficácia terapêutica dos fármacos nos sítios de infecção, tem sido amplamente estudados, uma

vez que apresentam várias vantagens, como a redução da dose e da frequência de administração, aumentando a adesão ao tratamento; possibilidade de direcionar os fármacos de forma específica para os macrófagos; aumento da concentração dos fármacos no sítio de infecção, promovendo uma redução no tempo do tratamento; redução da metabolização provocada pelo trato gastrointestinal e aumento da biodisponibilidade do ativo nos pulmões (COLOMBO, 2012). Dentre os métodos inalatórios mais apropriados para a entrega das formulações aos pulmões, a literatura cita a existência de duas preparações, as dispersões sólidas e as dispersões líquidas. Deste estas, as dispersões sólidas apresentam melhores propriedades quando comparadas com as líquidas, uma vez que as formulações líquidas são instáveis por conta do potencial de sedimentação, crescimento de cristais e por apresentarem polimorfismo (AL-HALLAK, 2011). Em contrapartida, as formulações inalatórias em pó apresentam maior estabilidade que as formulações inalatórias líquidas, não precisam ser armazenadas a baixa temperatura e são embaladas para proteção contra a luz e umidade, o que aumenta sua estabilidade (HANIF, 2012). Dentre as formulações utilizadas para veicular os fármacos na terapia anti-Tb, os lipossomas inalatórios tem sido utilizados devido às suas vantagens, como biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade, não imunogênicos, permite a encapsulação de vários fármacos na mesma formulação, possibilita a ancoragem de moléculas em sua superfície, permitindo a obtenção de lipossomas sítio-específicos e a capacidade de proporcionar uma liberação controlada dos fármacos (MEHANNA; MOHYELDIN; ELGINDY, 2014; BOZZUTO; MOLINARI, 2015; PATTN; CHUPIN; TORCHILIN, 2015). Vários trabalhos têm mostrado a obtenção de lipossomas inalatórios na terapia anti-Tb, abordando desde a farmacotécnica até sua aplicação *in vivo*. Shah e Misra (2004) desenvolveram uma dispersão lipossomal encapsulando amicacina cujo objetivo do trabalho foi avaliar o desempenho *in vitro* da formulação após a adição de finas partículas de lactose na superfície dos lipossomas. Os lipossomas foram preparados utilizando a técnica de evaporação por fase reversa, sendo utilizada posteriormente a extrusora (membranas de 2µm) a fim de obter lipossomas com um tamanho entre 1,9 e 2µm. Em seguida, a formulação foi liofilizada e o liófilo misturado com lactose (Pharmatose 325M, 63–90 µm) em várias proporções, entre 1:1 até 1:6. Também foi adicionado a lactose Sorbolac 500 em várias concentrações (5%, 10% e 15%). Para avaliar a liberação dos lipossomas, foi utilizado o dispositivo Rotahaler. Os autores

viram que a formulação com 10% de Sorbolac 500 e na proporção de 1:5 de lipossoma: lactose foi aquela que apresentou as melhores propriedades físicas para uma maior deposição *in vitro*, causada pela presença das finas partículas de lactose na superfície dos lipossomas. Já no trabalho desenvolvido por Changsan e colaboradores (2009), os autores encapsularam rifampicina em lipossomas visando a liberação do fármaco no trato respiratório. Os lipossomas foram obtidos pelo método de hidratação do filme lipídico sendo posteriormente liofilizado, utilizando manitol como agente crioprotetor. Para avaliar a citotoxicidade da formulação, foram utilizadas células epiteliais humanas brônquicas, pequenas células epiteliais das vias aéreas e macrófagos alveolares. Em seguida, autores avaliaram o MIC da rifampicina livre e encapsulada nos lipossomas contra *M. bovis*. Os autores viram que a estabilidade química da rifampicina foi maior na formulação liofilizada quando comparada com a solução aquosa do fármaco ou com a suspensão lipossomal. As formulações não foram citotóxicas para as células estudadas e houve uma redução do MIC para a rifampicina encapsulada (0,2µM) quando comparada com a rifampicina livre (0,8µM). Uma outra abordagem para a utilização de lipossomas como forma de veicular fármacos para o trato respiratório, são os prolipossomas. No trabalho proposto por Rojanarat e colaboradores (2012) prolipossomas contendo diferentes fármacos utilizados na terapia anti-Tb (isoniazida, pirazinamida e levofloxacina) foram obtidos a partir de micropartículas de manitol. As micropartículas foram ressuspensas em uma solução etanólica contendo os fármacos e os lipídios fosfatidilcolina e colesterol. Após sua secagem pelo método de *spray-dried* e ressuspensão em água, foi realizada a citotoxicidade da formulação em macrófagos, além de testar sua atividade contra *M. tuberculosis* e *M. bovis*. Os autores viram que a formulação não apresentou citotoxicidade, além de apresentar atividade anti-Tb contra as cepas testadas. Os estudos *in vivo* mostraram que não houve alteração nos valores das enzimas alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase; as concentrações sanguíneas da ureia e do nitrogênio ficaram dentro dos valores de referência e não houve hepatotoxicidade e nefrotoxicidade.

Diante do exposto, fica evidente que a via inalatória é importante para a administração dos ativos no tratamento anti-tb, uma vez que proporciona uma maior biodisponibilidade dos fármacos. Sabendo que os lipossomas sítio-específicos contendo AU são efetivamente capturados por macrófagos, as próximas etapas deste trabalho é a condução dos estudos *in vivo*, a fim de avaliar a administração do

AU encapsulado em lipossomas sítio-específicos para o tratamento de ratos infectados com o *M. tuberculosis*.

5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA FRENTE A MACRÓFAGOS INFECTADOS COM *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* H37RA

Uma vez que o Mtb é um parasita intracelular obrigatório, um dos maiores desafios para uma terapia eficaz contra a tuberculose é a eliminação da bactéria residente nos macrófagos (LAUZARDO, 2016). Desta forma, a utilização de novos compostos ativos, bem como o desenvolvimento de sistemas com bases nanotecnológicas capazes de carrear os fármacos para os macrófagos, por exemplo, tem recebido atenção por parte dos pesquisadores (FLEIGE, 2012). Neste sentido, avaliamos a capacidade de inibição do crescimento bacteriano intracelular após exposição ao AU e AU-Lipo-Fuc₅ utilizando RIF e EMB como fármacos padrão.

Após 42 dias de plaqueamento foi possível observar o crescimento do *M. tuberculosis*, indicando eficiência tanto na infecção dos macrófagos, como na recuperação das bactérias presentes no lisado dos macrófagos. Como descrito na tabela 4, observou-se que a rifampicina na concentração de 4 µg/mL foi capaz de eliminar de forma significativa as bactérias, apresentando baixa quantidade de UFC (0 a 5 UFC) em relação ao controle, macrófagos infectados sem tratamento, o qual apresentou uma quantidade superior a 20 UFC. Por outro lado, o etambutol, na concentração de 16 µg/mL, após os 42 dias mostrou uma menor atividade antimicobacteriana, uma vez que apresentou de 16 a 20 UFC. Este resultado pode ser explicado pelo fato do etambutol ser aquele que apresenta menor potência dentre os fármacos de primeira linha utilizados na terapia anti-Tb (LONGO et al., 2013). O ácido úsnico na sua forma livre na concentração de 3,42 µg/mL apresentou atividade similar a rifampicina (0-5 UFC) e melhor atividade em comparação ao etambutol, mesmo com uma concentração 4,67 vezes menor. A atividade antimicobacteriana do ácido úsnico já foi previamente descrita na literatura (HONDA, 2010; RAMOS, 2010; FERRAZ-CARVALHO, 2016), no entanto, não há registro da sua ação frente ao *M. tuberculosis* dentro dos macrófagos conforme descrito neste trabalho. Em relação ao Au-Lipo-Fuc₅, também foi observada uma redução nas UFC (6 a 10 UFC) em relação ao controle (> 20 UFC) após os 42 dias de incubação, embora menos significativa que o ácido úsnico na sua forma livre. Esta menor

atividade antimicobacteriana do AU-Lipo-Fuc₅ em comparação com o AU livre pode estar associado às regras de Lipinski, as quais explicam que uma baixa permeação de uma dada molécula ocorre quando 1) a lipofilicidade calculada da molécula é acima de 5; 2) seu peso molecular é maior que 500; 3) a molécula apresenta mais de cinco ligações doadoras de hidrogênio e 4) mais de 10 ligações receptoras de hidrogênio. Uma vez que o AU não quebra nenhuma das regras de Lipinski (baixa lipofilicidade calculada (-0,51); peso molecular menor que 500 (361.36 g/mol); poucas ligações doadoras de hidrogênio (1 ligação) e menos que 10 ligações aceptoras de hidrogênio (7 ligações), a molécula do ácido úsnico apresenta boa permeabilidade através da membrana plasmática, bem como através do citoplasma, o que pode explicar sua maior atividade contra o *M. tuberculosis*. Porém, apesar da notável ação antimicobacteriana do ácido úsnico, sua utilização na forma livre não é adequada, uma vez que esta molécula apresenta baixa solubilidade em água (INGÓLFSDÓTTIR, 2002) e elevada toxicidade (BROWN, 2017) sendo hepatotóxico (PRAMYOTHIN, 2004), cardiotóxico (YOKOUCHI, 2015) além de apresentar propriedades alergênicas (SALO, 1981; SHEU, 2006; PACHECO, 2014). Neste sentido, a formulação aqui apresentada torna-se uma alternativa importante para explorar o potencial anti-TB deste fármaco, atrelado a uma possível diminuição da toxicidade. Vale salientar que outras formulações lipossomais contendo ácido úsnico e fucana foram utilizadas no estudo da avaliação antimicobacteriana, porém os dados não puderam ser obtidos e expressos neste trabalho, tendo em vista uma contaminação bacteriana.

Tabela 4: Atividade frente a macrófagos infectadas pelo *Mycobacterium tuberculosis* após 42 dias de incubação. As cruzes correspondem ao número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC), da seguinte forma: 0-5 UFC: +; 6-10 UFC: ++; 11-15 UFC: +++; 16-20 UFC: ++++; >20 UFC: +++++.

AMOSTRA	[FÁRMACO]µg/mL	UFC
Macrófago infectado	---	+++++
Rifampicina	4,0	+
Etambutol	16	++++
AU	3,42	+
AU-Lipo-Fuc ₅	3,42	++

Como dito anteriormente, vários pesquisadores têm voltado seus esforços para a aplicação da nanotecnologia como ferramenta para o combate à TB, em especial frente a macrófagos infectados com cepas do gênero *Mycobacterium*. Recentemente, Upadhyay e colaboradores (2019) desenvolveram micropartículas de Beta-glucana e encapsularam Rifabutina a fim de avaliar a atividade antimicobacteriana do nanossistema e do fármaco livre frente a macrófagos J774 infectados com *Mycobacterium tuberculosis* em diferentes tempos (0, 48 e 72h). Os autores notaram que os macrófagos infectados e tratados com este nanossistema apresentaram uma redução significativa na sobrevivência do Mtb (redução de 28,65 ± 1,9% de sobrevivência do Mtb intracelular após 48h de tratamento e 34,18% após 72h) quando comparado com macrófagos sem tratamento, os quais não apresentam redução na sobrevivência do Mtb, corroborando os resultados do presente trabalho.

Uma vez que os macrófagos são as células alvo da terapia anti-Tb (LAUZARDO, 2016), garantir que a terapia seja tóxica apenas para a micobactéria intracelular é de suma importância. Assim, levando em consideração o trabalho proposto por Ferraz e colaboradores (2015), onde foi avaliada a citotoxicidade do AU livre e encapsulado em lipossomas revestidos com fucana frente à macrófagos RAW 264,7, e que o IC₅₀ do AU-Lipo-Fuc₅ foi em torno de 10.47 ± 0.60 µM, a concentração escolhida para a condução do presente trabalho (5,80µM) foi abaixo da dose tóxica descrita por Ferraz, garantindo que as formulações utilizadas neste estudo não apresentassem qualquer tipo de toxicidade para os macrófagos.

Outro fator importante é avaliar a internalização do AU encapsulado em lipossomas. No trabalho desenvolvido por Lira e colaboradores (2009), os autores avaliaram o tempo de permanência do AU em macrófagos J774, tanto em sua forma

livre como em sua forma encapsulada em lipossomas convencionais (AU-Lipo). Os resultados mostraram que AU-Lipo aumentou o tempo de permanência do AU dentro do macrófago, uma vez que 92% do AU encapsulado permaneceu dentro da célula após 30h. Ao contrário, para o AU livre, após 8h havia apenas 48% de fármaco internalizado, reduzindo para 24% após 30h. Assim, os estudos *in vitro* mostraram que o AU-Lipo foi consideravelmente internalizado pelos macrófagos J774.

Atrelado à nanotecnologia, os pesquisadores vêm utilizando moléculas sinalizadoras com o intuito de direcionar os nanossistemas para macrófagos infectados. Em nosso estudo, a fucana foi utilizada como molécula sinalizadora uma vez que os macrófagos expressam *macrophages scavenger receptors*, os quais reconhecem a fucose, monossacarídeo presente na estrutura química da fucana, além de interagir com a carga negativa dos grupamentos sulfato também presentes na fucana (KIM; ORDIJA; FRREMAN, 2003; MUKHOPADHYAY; GORDON, 2004; TISSOT et al, 2003). No trabalho desenvolvido por Pi e colaboradores (2019), os autores desenvolveram nanopartículas de óxido de grafeno recobertas com manose. A fim de avaliar a influência desse polissacarídeo na captura dos nanossistemas por macrófagos do tipo THP-1, os autores prepararam nanopartículas com manose (GO-PEG-MAN) e sem manose (GO-PEG). A concentração das nanopartículas/macrófagos foi quantificada através de uma curva padrão onde foram utilizadas concentrações conhecidas das nanopartículas. Os resultados foram expressos de acordo com a concentração dos nanossistemas em $\mu\text{g}/10^8$ macrófagos. Os autores observaram que as nanopartículas recobertas com manose apresentaram a capacidade de direcionar o nanossistema para os macrófagos de forma mais eficaz quando comparada com as nanopartículas sem revestimento uma vez que a concentração das nanopartícula recobertas com este polissacarídeo ($600\mu\text{g}/10^8$ macrófagos) foi maior quando comparado com a concentração de nanopartículas/macrófago sem manose ($380\mu\text{g}/10^8$ macrófagos). Os autores também viram que o nanossistema recoberto com manose e contendo o fármaco rifampicina (Rif-GO-PEG-MAN) promoveu um aumento na concentração do fármaco ($150\text{ng}/10^6$) dentro do macrófago quando comparado com o fármaco livre ($50\text{ng}/10^6$). Quando testados em macrófagos (obtidos a partir de monócitos) infectados com *M. tuberculosis*, O Rif-GO-PEG-MAN promoveu uma menor sobrevivência do Mtb intracelular (500 CFU) quando comparado com o fármaco livre

(5000 CFU). Assim, percebe-se que as moléculas sinalizadoras favorecem a internalização dos nanossistemas por macrófagos infectados.

De posse destes dados, é notória a importância da utilização de fármacos em sua forma encapsulada no tratamento de doenças onde o patógeno infecta macrófagos, uma vez que através da nanotecnologia é possível aumentar a concentração do ativo dentro destas células (LIRA, 2008; ALI, 2016; PI, 2019). Em conjunto com a nanotecnologia, a utilização de moléculas sinalizadoras permite desenhar sistemas inteligentes com a capacidade de realizar uma entrega sítio-específica. Assim, os resultados sugerem que a utilização do AU encapsulado em lipossomas revestidos com fucana pode ser uma alternativa para o tratamento de macrófagos infectados com o *M. tuberculosis*, uma vez que este nanossistema apresentou atividade similar e até mesmo maior que a atividade de fármacos utilizados na terapia atual, como a rifampicina e o etambutol, por exemplo.

6 CONCLUSÃO

Os resultados do FTIR e do DSC mostraram que a conjugação do colesterol com a fucana ocorreu de forma efetiva. Já os dados do EDX revelaram a presença de enxofre na fucana livre (20,94%) e na fucana conjugada ao colesterol (22,19%). Os resultados mostraram que a captura celular foi dependente do tempo e da concentração de fucana. Além disso, atrelada às propriedades físico-químicas causadas pela presença da fucana na superfície, os nanossistemas foram internalizados por diferentes vias endocíticas, dentre elas, a vias dependentes de clatrina, caveolina e macropinocitose. O tamanho de partícula das formulações Lipo-Fuc₅ e Lipo-Fuc₁₀ foi crucial para a diferença encontrada nas vias de endocitose dos nanossistemas, uma vez que o Lipo-Fuc₁₀ apresentou tamanho na escala micro, levando-o a ser internalizado pela via da macropinocitose. Os estudos de atividade antimicobacteriana de lipossomas revestidos com fucana encapsulando ácido úsnico frente a macrófagos infectados com *M. tuberculosis* mostraram que o ácido úsnico nanoencapsulado apresentou ação anti-TB similar ou até maior quando comparado com fármacos de referência no tratamento da TB. Uma vez que lipossomas contendo ácido úsnico recobertos com fucana apresentando atividade anti-TB nunca foram desenvolvidos anteriormente, esta proposta vem como uma nova ferramenta no combate à TB.

REFERÊNCIAS

ABDELGHANY, Sharif et al. Alginate modified-PLGA nanoparticles entrapping amikacin and moxifloxacin as a novel host-directed therapy for multidrug-resistant tuberculosis. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 52, p. 642-651, 2019.

ABED, Nadia; COUVREUR, Patrick. Nanocarriers for antibiotics: A promising solution to treat intracellular bacterial infections. **International journal of antimicrobial agents**, v. 43, n. 6, p. 485-496, 2014.

ADALBJÖRNSSON, Björn V.; JÓNSDÓTTIR, Rósa. Enzyme-enhanced extraction of antioxidant ingredients from algae. In: **Natural Products From Marine Algae**. Humana Press, New York, NY, 2015. p. 145-150.

AHMAD, Zahoor; MAKAYA, Nusrat Habib; GROSSET, Jacques. History of drug discovery: Early evaluation studies and lessons learnt from them. In: **Antituberculosis chemotherapy**. Karger Publishers, 2011. p. 2-9.

AHSAN, Fakhrul et al. Targeting to macrophages: role of physicochemical properties of particulate carriers—liposomes and microspheres—on the phagocytosis by macrophages. **Journal of controlled release**, v. 79, n. 1-3, p. 29-40, 2002.

AKHTER, Md Habban et al. Nanocarriers in advanced drug targeting: setting novel paradigm in cancer therapeutics. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, v. 46, n. 5, p. 873-884, 2018.

ALI, Hala R. et al. Gold nanorods as drug delivery vehicles for rifampicin greatly improve the efficacy of combating Mycobacterium tuberculosis with good biocompatibility with the host cells. **Bioconjugate chemistry**, v. 27, n. 10, p. 2486-2492, 2016.

AL-HALLAK, MHD Kamal et al. Pulmonary delivery of inhalable nanoparticles: dry powder inhalers. **Therapeutic delivery**, v. 2, n. 10, p. 1313-1324, 2011.

ANAND, A. C. et al. Risk factors of hepatotoxicity during anti-tuberculosis treatment. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 62, n. 1, p. 45-49, 2006.

ANTONENKO, Yuri N. et al. Mechanism of action of an old antibiotic revisited: role of calcium ions in protonophoric activity of usnic acid. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1860, n. 4, p. 310-316, 2019.

ARAÚJO, Hallysson DA et al. In vitro activity of usnic acid potassium salt against different developmental stages of Schistosoma mansoni: An ultrastructural study. **Acta tropica**, v. 201, p. 105159, 2020.

ARVIZO, Rochelle R. et al. Modulating pharmacokinetics, tumor uptake and biodistribution by engineered nanoparticles. **PloS one**, v. 6, n. 9, 2011.

ASAHINA, Yasuhiko et al. Chemistry of lichen substances. 1954.

BAHUGUNA, Aparna; RAWAT, Diwan S. An overview of new antitubercular drugs, drug candidates, and their targets. **Medicinal research reviews**, v. 40, n. 1, p. 263-292, 2020.

BARRY, Clifton E. et al. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 12, p. 845-855, 2009.

BASHA, Rubaiya Yunus; TS, Sampath Kumar; DOBLE, Mukesh. Dual delivery of tuberculosis drugs via cyclodextrin conjugated curdlan nanoparticles to infected macrophages. **Carbohydrate Polymers**, v. 218, p. 53-62, 2019.

BATISTA, Cinthia Meireles; CARVALHO, Cícero Moraes Barros de; MAGALHÃES, Nereide Stela Santos. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 167-179, 2007.

BERTRAND, Nicolas et al. Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. **Advanced drug delivery reviews**, v. 66, p. 2-25, 2014.

BLUMBERG, Henry M. et al. American thoracic society/centers for disease control and prevention/infectious diseases society of America: treatment of tuberculosis. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 167, n. 4, p. 603, 2003.

BOZZUTO, Giuseppina; MOLINARI, Agnese. Liposomes as nanomedical devices. **International journal of nanomedicine**, v. 10, p. 975, 2015.

BRASIL, MrdSd. Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias. **Brasília, DF, Brasil.: Ministério da Saúde, Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica**, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasil Livre da Tuberculose : Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose como Problema de Saúde Pública / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília : **Ministério da Saúde**, 2017.

BRAUNGER, Julia A. et al. Phosphatidylinositol 4, 5-Bisphosphate Alters the Number of Attachment Sites between Ezrin and Actin Filaments A COLLOIDAL PROBE STUDY. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 14, p. 9833-9843, 2014.

BRETOU, Marine et al. Cdc42 controls the dilation of the exocytotic fusion pore by regulating membrane tension. **Molecular biology of the cell**, v. 25, n. 20, p. 3195-3209, 2014.

BRIONES, Elsa; COLINO, Clara Isabel; LANA O, José M. Delivery systems to increase the selectivity of antibiotics in phagocytic cells. **Journal of Controlled Release**, v. 125, n. 3, p. 210-227, 2008.

BROWN, Amy Christine. Liver toxicity related to herbs and dietary supplements: Online table of case reports. Part 2 of 5 series. **Food and chemical toxicology**, v. 107, p. 472-501, 2017.

BRUNING, John B. et al. Structure of the Mycobacterium tuberculosis D-alanine: D-alanine ligase, a target of the antituberculosis drug D-cycloserine. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 1, p. 291-301, 2011.

BURLANDO, Bruno et al. Antiproliferative effects on tumour cells and promotion of keratinocyte wound healing by different lichen compounds. **Planta medica**, v. 75, n. 06, p. 607-613, 2009.

CAMEL, Valérie. Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 19, n. 4, p. 229-248, 2000.

CARVALHO, Rafaela de Siqueira Ferraz. Desenvolvimento e atividade biológica de lipossomas sítio-específicos contendo ácido úsnico para o tratamento da tuberculose. 2015.

CHAKRABORTY, Sumit et al. Para-aminosalicylic acid acts as an alternative substrate of folate metabolism in Mycobacterium tuberculosis. **Science**, v. 339, n. 6115, p. 88-91, 2013.

CHANGSAN, Narumon et al. Physicochemical characterization and stability of rifampicin liposome dry powder formulations for inhalation. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 98, n. 2, p. 628-639, 2009.

CHELLAT, Fatiha et al. Therapeutic potential of nanoparticulate systems for macrophage targeting. **Biomaterials**, v. 26, n. 35, p. 7260-7275, 2005.

CHEMAT, Farid et al. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 34, p. 540-560, 2017.

CHIBA, Sahoko et al. Rifampicin-induced acute kidney injury during the initial treatment for pulmonary tuberculosis: a case report and literature review. **Internal Medicine**, v. 52, n. 21, p. 2457-2460, 2013.

COCCHIETTO, Moreno et al. A review on usnic acid, an interesting natural compound. **Naturwissenschaften**, v. 89, n. 4, p. 137-146, 2002.

COLOMBO, Paolo; TRAINI, Daniela; BUTTINI, Francesca. Inhalation drug delivery. **First, First edition, Chichester, West Sussex**, 2012.

CUMASHI, Albana et al. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. **Glycobiology**, v. 17, n. 5, p. 541-552, 2007.

CUNHA, Ludmylla; GRENHA, Ana. Sulfated seaweed polysaccharides as multifunctional materials in drug delivery applications. **Marine drugs**, v. 14, n. 3, p. 42, 2016.

DE CARVALHO, E. A. B. et al. Effect of usnic acid from the lichen *Cladonia substellata* on *Trypanosoma cruzi* in vitro: an ultrastructural study. **Micron**, v. 36, n. 2, p. 155-161, 2005.

DE CURTIS, Ivan; MELDOLESI, Jacopo. Cell surface dynamics—how Rho GTPases orchestrate the interplay between the plasma membrane and the cortical cytoskeleton. **Journal of cell science**, v. 125, n. 19, p. 4435-4444, 2012.

DE JAGER, P.; VAN ALTENA, R. Hearing loss and nephrotoxicity in long-term aminoglycoside treatment in patients with tuberculosis. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 6, n. 7, p. 622-627, 2002.

DE SOUZA, Micheline Cristiane Rocha et al. Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds. **Journal of applied phycology**, v. 19, n. 2, p. 153-160, 2007.

DIAB, R. et al. Formulation and in vitro characterization of inhalable polyvinyl alcohol-free rifampicin-loaded PLGA microspheres prepared with sucrose palmitate as stabilizer: efficiency for ex vivo alveolar macrophage targeting. **International journal of pharmaceutics**, v. 436, n. 1-2, p. 833-839, 2012.

DIZ-MUÑOZ, Alba; FLETCHER, Daniel A.; WEINER, Orion D. Use the force: membrane tension as an organizer of cell shape and motility. **Trends in cell biology**, v. 23, n. 2, p. 47-53, 2013.

DOHERTY, Gary J. et al. The endocytic protein GRAF1 is directed to cell-matrix adhesion sites and regulates cell spreading. **Molecular biology of the cell**, v. 22, n. 22, p. 4380-4389, 2011.

DOHERTY, Jason T. et al. Skeletal muscle differentiation and fusion are regulated by the BAR-containing Rho-GTPase-activating protein (Rho-GAP), GRAF1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 29, p. 25903-25921, 2011.

DYE, Christopher et al. Prospects for tuberculosis elimination. **Annual review of public health**, v. 34, 2013.

ELO, Hannu; MATIKAINEN, Jorma; PELTTARI, Eila. Potent activity of the lichen antibiotic (+)-usnic acid against clinical isolates of vancomycin-resistant enterococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Naturwissenschaften**, v. 94, n. 6, p. 465-468, 2007.

FERNANDES-NEGREIROS, Marília Medeiros et al. Antibacterial, antiproliferative, and immunomodulatory activity of silver nanoparticles synthesized with fucans from the alga *Dictyota mertensii*. **Nanomaterials**, v. 8, n. 1, p. 6, 2018.

FERRARI, Aldo et al. Caveolae-mediated internalization of extracellular HIV-1 tat fusion proteins visualized in real time. **Molecular therapy**, v. 8, n. 2, p. 284-294, 2003.

FERRAZ-CARVALHO, Rafaela S. et al. Effects of the encapsulation of usnic acid into liposomes and interactions with antituberculous agents against multidrug-resistant tuberculosis clinical isolates. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 5, p. 330-334, 2016.

FLEIGE, Emanuel; QUADIR, Mohiuddin A.; HAAG, Rainer. Stimuli-responsive polymeric nanocarriers for the controlled transport of active compounds: concepts and applications. **Advanced drug delivery reviews**, v. 64, n. 9, p. 866-884, 2012.

FLÓREZ-FERNÁNDEZ, Noelia et al. Potential of intensification techniques for the extraction and depolymerization of fucoidan. **Algal research**, v. 30, p. 128-148, 2018.

FRANCOLINI, I. et al. Usnic acid, a natural antimicrobial agent able to inhibit bacterial biofilm formation on polymer surfaces. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 11, p. 4360-4365, 2004.

GEELLEN, Tessa et al. Internalization of paramagnetic phosphatidylserine-containing liposomes by macrophages. **Journal of nanobiotechnology**, v. 10, n. 1, p. 37, 2012.

GRASSO, L.; GHIRARDI, P. E.; GHIONE, M. Usnic acid, a selective antimicrobial agent against *Streptococcus mutans*: a pilot clinical study. **Current therapeutic research**, v. 45, n. 6, p. 1067-1070, 1989.

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

HAN, Xiang Y. et al. A new *Mycobacterium* species causing diffuse lepromatous leprosy. **American journal of clinical pathology**, v. 130, n. 6, p. 856-864, 2008.

HANIF, Shumaila N. Muhammad; GARCIA-CONTRERAS, Lucila. Pharmaceutical aerosols for the treatment and prevention of tuberculosis. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, p. 118, 2012.

HARRIS, James et al. Caveolae and caveolin in immune cells: distribution and functions. **Trends in immunology**, v. 23, n. 3, p. 158-164, 2002.

HARUSH-FRENKEL, Oshrat et al. Targeting of nanoparticles to the clathrin-mediated endocytic pathway. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 353, n. 1, p. 26-32, 2007.

HARUSH-FRENKEL, Oshrat et al. Surface charge of nanoparticles determines their endocytic and transcytotic pathway in polarized MDCK cells. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 2, p. 435-443, 2008.

HE, Chunbai et al. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. **Biomaterials**, v. 31, n. 13, p. 3657-3666, 2010.

HEYMANN, David L. et al. **Control of communicable diseases manual**. American Public Health Association, 2008.

HICKEY, A. J. et al. Inhaled drug treatment for tuberculosis: past progress and future prospects. **Journal of Controlled Release**, v. 240, p. 127-134, 2016.

HONDA, N. K. et al. Antimycobacterial activity of lichen substances. **Phytomedicine**, v. 17, n. 5, p. 328-332, 2010.

HUNECK, S. The significance of lichens and their metabolites. **Die Naturwissenschaften**, v. 86, n. 12, p. 559-570, 1999.

INGÓLFSDÓTTIR, K.; BLOOMFIELD, S. F.; HYLANDS, P. J. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of lichen metabolites as potential preservatives. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 28, n. 2, p. 289-292, 1985.

INGOLFSDOTTIR, K. Usnic acid. **Phytochemistry**, v. 61, n. 7, p. 729-736, 2002.

JAHAGIRDAR, Priyanka S. et al. Intramacrophage delivery of dual drug loaded nanoparticles for effective clearance of Mycobacterium tuberculosis. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2020.

KARLSON, Tanya De L. et al. The signalling imprints of nanoparticle uptake by bone marrow derived dendritic cells. **Methods**, v. 60, n. 3, p. 275-283, 2013.

KERR, Markus C.; TEASDALE, Rohan D. Defining macropinocytosis. **Traffic**, v. 10, n. 4, p. 364-371, 2009.

KIM, Woojin Scott; ORDIJA, Christine M.; FREEMAN, Mason W. Activation of signaling pathways by putative scavenger receptor class A (SR-A) ligands requires CD14 but not SR-A. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 310, n. 2, p. 542-549, 2003.

KOUL, Anil et al. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. **Nature**, v. 469, n. 7331, p. 483-490, 2011.

KRAJEWSKA, Wanda M.; MASLOWSKA, I. Caveolins: structure and function in signal transduction. **CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY LETTERS**, v. 9, n. 2, p. 195-220, 2004.

KUMAR KC, Sunil; MÜLLER, Klaus. Lichen metabolites. 2. Antiproliferative and cytotoxic activity of gyrophoric, usnic, and diffractaic acid on human keratinocyte growth. **Journal of natural products**, v. 62, n. 6, p. 821-823, 1999.

KUMAR, Kunal; MISHRA, Jai PN; SINGH, Rana P. Usnic acid induces apoptosis in human gastric cancer cells through ROS generation and DNA damage and causes up-regulation of DNA-PKcs and γ -H2A. X phosphorylation. **Chemico-biological interactions**, v. 315, p. 108898, 2020.

KUMAR, Palanirajan Vijayaraj et al. Intracellular macrophage uptake of rifampicin loaded mannosylated dendrimers. **Journal of drug targeting**, v. 14, n. 8, p. 546-556, 2006.

KUMAR, Ramesh et al. Antituberculosis therapy-induced acute liver failure: magnitude, profile, prognosis, and predictors of outcome. **Hepatology**, v. 51, n. 5, p. 1665-1674, 2010.

KUPCHAN, S. Morris; KOPPERMAN, Herbert L. L-Usnic acid: tumor inhibitor isolated from lichens. **Experientia**, v. 31, n. 6, p. 625-625, 1975.

KYLIN, H. Biochemistry of sea algae. **HZ Physiol. Chem**, v. 83, n. 171197, p. 3, 1913.

LAUZARDO, Michael; PELOQUIN, Charles A. Tuberculosis therapy for 2016 and beyond. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 17, n. 14, p. 1859-1872, 2016.

LIN, Yu-Hsin et al. Genipin-cross-linked fucose-chitosan/heparin nanoparticles for the eradication of *Helicobacter pylori*. **Biomaterials**, v. 34, n. 18, p. 4466-4479, 2013.

LIRA, Mariane Cajubá de Britto. Estudo da utilização da Fucana como agente de direcionamento de nanopartículas para macrófagos. 2009a.

LIRA, Mariane CB et al. In vitro uptake and antimycobacterial activity of liposomal usnic acid formulation. **Journal of liposome research**, v. 19, n. 1, p. 49-58, 2009b.

LIRA, M. C. B. et al. Cytotoxicity and cellular uptake of newly synthesized fucoidan-coated nanoparticles. **European journal of pharmaceuticals and biopharmaceuticals**, v. 79, n. 1, p. 162-170, 2011.

LIU, Cui Hua; LIU, Haiying; GE, Baoxue. Innate immunity in tuberculosis: host defense vs pathogen evasion. **Cellular & molecular immunology**, v. 14, n. 12, p. 963-975, 2017.

LONGO, Dan L. et al. Medicina interna de Harrison. In: **Medicina interna de Harrison**. 2013. p. 1796-1796.

LU, Kun-Ying et al. Development of a new type of multifunctional fucoidan-based nanoparticles for anticancer drug delivery. **Carbohydrate polymers**, v. 165, p. 410-420, 2017.

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

LUO, Xuan et al. Zanthoxylum capense constituents with antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* in vitro and ex vivo within human macrophages. **Journal of ethnopharmacology**, v. 146, n. 1, p. 417-422, 2013.

MARCANO, V.; RODRIGUEZ-ALCOCER, V.; MENDEZ, A. Morales. Occurrence of usnic acid in *Usnea laevis* Nylander (lichenized ascomycetes) from the Venezuelan Andes. **Journal of ethnopharmacology**, v. 66, n. 3, p. 343-346, 1999.

MARSHALL, G. Streptomycin in the treatment of pulmonary tuberculosis. A Medical Research Council investigation. **BMJ** **1**, 382–386 (1949).

MAYER, Margareth et al. Usnic acid: a non-genotoxic compound with anti-cancer properties. **Anti-cancer drugs**, v. 16, n. 8, p. 805-809, 2005.

MCMAHON, Harvey T.; BOUCROT, Emmanuel. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 12, n. 8, p. 517, 2011.

MEHANNA, Mohammed M.; MOHYELDIN, Salma M.; ELGINDY, Nazik A. Respirable nanocarriers as a promising strategy for antitubercular drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 187, p. 183-197, 2014.

MEHTA, Piyush et al. Potential of dry powder inhalers for tuberculosis therapy: facts, fidelity and future. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, v. 46, n. sur3p3, p. S791-S806, 2018.

MEIER, Oliver et al. Adenovirus triggers macropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake. **The Journal of cell biology**, v. 158, n. 6, p. 1119-1131, 2002.

MONTI, Daria Maria et al. Biocompatibility, uptake and endocytosis pathways of polystyrene nanoparticles in primary human renal epithelial cells. **Journal of biotechnology**, v. 193, p. 3-10, 2015.

MOREIRA, Caroline T. et al. Harmful effects of usnic acid on hepatic metabolism. **Chemico-biological interactions**, v. 203, n. 2, p. 502-511, 2013.

MOSAIAB, Tamim et al. Carbohydrate-based nanocarriers and their application to target macrophages and deliver antimicrobial agents. **Advanced drug delivery reviews**, v. 151, p. 94-129, 2019.

MOURÃO, Paulo AS. Use of sulfated fucans as anticoagulant and antithrombotic agents: future perspectives. **Current pharmaceutical design**, v. 10, n. 9, p. 967-981, 2004.

MUKHOPADHYAY, Subhankar; GORDON, Siamon. The role of scavenger receptors in pathogen recognition and innate immunity. **Immunobiology**, v. 209, n. 1-2, p. 39-49, 2004.

MÜLLER, K. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 1-2, p. 9-16, 2001.

NARASIMHAN, P. et al. Review article risk factors for tuberculosis. **submitted to Pulm Medicine vo1 2013, Hindawi Publishing Corporation**, 2013.

ODABASOGLU, Fehmi et al. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 103, n. 1, p. 59-65, 2006.

OLIVEIRA, Catarina et al. Fucoidan from *Fucus vesiculosus* inhibits new blood vessel formation and breast tumor growth in vivo. **Carbohydrate polymers**, v. 223, p. 115034, 2019.

ORME, Ian M.; BASARABA, Randall J. The formation of the granuloma in tuberculosis infection. In: **Seminars in immunology**. Academic Press, 2014. p. 601-609.

PACHECO, D. et al. Occupational airborne contact dermatitis caused by usnic acid in a domestic worker. **Allergologia et immunopathologia**, v. 42, n. 1, p. 80-82, 2014.

PARUMASIVAM, Thaigarajan et al. Dry powder inhalable formulations for anti-tubercular therapy. **Advanced drug delivery reviews**, v. 102, p. 83-101, 2016.

PERIERA, E. C. et al. Analysis of *Usnea fasciata* crude extracts with antineoplastic activity. **The Tokai journal of experimental and clinical medicine**, v. 19, n. 1-2, p. 47-52, 1994.

PETAZZI, Roberto Arturo et al. Time-controlled phagocytosis of asymmetric liposomes: application to phosphatidylserine immunoliposomes binding HIV-1 virus-like particles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 11, n. 8, p. 1985-1992, 2015.

PATTNI, Bhushan S.; CHUPIN, Vladimir V.; TORCHILIN, Vladimir P. New developments in liposomal drug delivery. **Chemical reviews**, v. 115, n. 19, p. 10938-10966, 2015.

PI, Jiang et al. Mannosylated graphene oxide as macrophage-targeted delivery system for enhanced intracellular *M. tuberculosis* killing efficiency. **Materials Science and Engineering: C**, v. 103, p. 109777, 2019.

PHAM, Dinh-Duy; FATTAL, Elias; TSAPIS, Nicolas. Pulmonary drug delivery systems for tuberculosis treatment. **International journal of pharmaceutics**, v. 478, n. 2, p. 517-529, 2015.

PILCER, Gabrielle; AMIGHI, Karim. Formulation strategy and use of excipients in pulmonary drug delivery. **International journal of pharmaceutics**, v. 392, n. 1-2, p. 1-19, 2010.

PIOVANO, Marisa et al. Secondary metabolites in the genus *Sticta* (lichens). **Biochemical systematics and ecology**, v. 28, n. 6, p. 589-590, 2000.

POMIN, Vitor H. Fucanomics and galactanomics: Marine distribution, medicinal impact, conceptions, and challenges. **Marine drugs**, v. 10, n. 4, p. 793-811, 2012.

PRABAKARAN, D. et al. Osmotically regulated asymmetric capsular systems for simultaneous sustained delivery of anti-tubercular drugs. **Journal of controlled release**, v. 95, n. 2, p. 239-248, 2004.

PRAMYOTHIN, Pornpen et al. Hepatotoxic effect of (+) usnic acid from *Usnea siamensis* Wainio in rats, isolated rat hepatocytes and isolated rat liver mitochondria. **Journal of ethnopharmacology**, v. 90, n. 2-3, p. 381-387, 2004.

PYM, A. S. & Cole, S. T. in *Bacterial Resistance to Antimicrobials 2nd Edn* (eds Wax, R. G., Lewis, K., Salyers, A. A. & Taber, H.) 313–342 (CRC, 2008).

RAMOS, Daniela Fernandes; ALMEIDA DA SILVA, Pedro Eduardo. Antimycobacterial activity of usnic acid against resistant and susceptible strains of *Mycobacterium tuberculosis* and non-tuberculous mycobacteria. **Pharmaceutical biology**, v. 48, n. 3, p. 260-263, 2010.

RANJBAR, Shahin et al. A role for IFITM proteins in restriction of *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Cell reports**, v. 13, n. 5, p. 874-883, 2015.

REJMAN, Joanna et al. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. **Biochemical journal**, v. 377, n. 1, p. 159-169, 2004.

RIBEIRO, Ana-Cristina et al. A sulfated α -L-fucan from sea cucumber. **Carbohydrate research**, v. 255, p. 225-240, 1994.

RODRIGUEZ-JASSO, Rosa M. et al. Microwave-assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from brown seaweed. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 3, p. 1137-1144, 2011.

ROJANARAT, Wipaporn et al. Levofloxacin-proliposomes: opportunities for use in lung tuberculosis. **Pharmaceutics**, v. 4, n. 3, p. 385-412, 2012.

SAHAY, Gaurav; ALAKHOVA, Daria Y.; KABANOV, Alexander V. Endocytosis of nanomedicines. **Journal of controlled release**, v. 145, n. 3, p. 182-195, 2010.

SALIAN, Sumantha et al. Structure-activity relationships among the kanamycin aminoglycosides: role of ring I hydroxyl and amino groups. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 12, p. 6104-6108, 2012.

SALO, H.; HANNUKSELA, M.; HAUSEN, B. Lichen picker's dermatitis (*Cladonia alpestris* (L) Rab.). **Contact Dermatitis**, v. 7, n. 1, p. 9-13, 1981.

SARAVANA, Periaswamy Sivagnanam et al. Structural, antioxidant, and emulsifying activities of fucoidan from *Saccharina japonica* using pressurized liquid extraction. **Carbohydrate polymers**, v. 153, p. 518-525, 2016.

SARIN, Rohit et al. Second line injectable induced ototoxicity in drug resistant tuberculosis: A systematic review of Indian studies. **Indian Journal of Tuberculosis**, 2019.

SAUNDERS, Bernadette M.; BRITTON, Warwick J. Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis. **Immunology and cell biology**, v. 85, n. 2, p. 103-111, 2007.

SCHATZ, Albert; BUGLE, Elizabeth; WAKSMAN, Selman A. Streptomycin, a Substance Exhibiting Antibiotic Activity Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria.*. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 55, n. 1, p. 66-69, 1944.

SCIRPA, P. et al. Terapia adiuvante con un preparato a base di zinco solfato e acido usnico delle lesioni genitali da human papilloma virus (hvp) dopo trattamento chirurgico distruttivo. **Minerva ginecologica**, v. 51, n. 6, p. 255-260, 1999.

SHAH, Shrenik P.; MISRA, Ambikanandan. Liposomal amikacin dry powder inhaler: effect of fines on in vitro performance. **AAPS PharmSciTech**, v. 5, n. 4, p. 107-113, 2004.

SHAMAY, Yosi et al. P-selectin is a nanotherapeutic delivery target in the tumor microenvironment. **Science translational medicine**, v. 8, n. 345, p. 345ra87-345ra87, 2016.

SHARMA, R. K.; JANNKE, P. J. Acidity of usnic acid. **Indian Journal of Chemistry**, v. 4, n. 1, p. 16-&, 1966.

SHEU, Mary et al. Allergic contact dermatitis from a natural deodorant: a report of 4 cases associated with lichen acid mix allergy. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 55, n. 2, p. 332-337, 2006.

SHI, Wanliang et al. Pyrazinamide inhibits trans-translation in *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, v. 333, n. 6049, p. 1630-1632, 2011.

SHIBESHI, Workineh et al. Nephrotoxicity and ototoxic symptoms of injectable second-line anti-tubercular drugs among patients treated for MDR-TB in Ethiopia: a retrospective cohort study. **BMC Pharmacology and Toxicology**, v. 20, n. 1, p. 31, 2019.

SINGODIA, Deepak et al. Investigations into an alternate approach to target mannose receptors on macrophages using 4-sulfated N-acetyl galactosamine more efficiently in comparison with mannose-decorated liposomes: an application in drug

delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 8, n. 4, p. 468-477, 2012.

SIRGEL, Frederick A. et al. gyrA mutations and phenotypic susceptibility levels to ofloxacin and moxifloxacin in clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 67, n. 5, p. 1088-1093, 2012.

SIRGEL, Frederick A. et al. Mutations in the rrs A1401G gene and phenotypic resistance to amikacin and capreomycin in Mycobacterium tuberculosis. **Microbial drug resistance**, v. 18, n. 2, p. 193-197, 2012.

SIVAKUMAR, P. A.; RAO, K. Panduranga. The use of cholesteryl pullulan for the preparation of stable vincristine liposomes. **Carbohydrate polymers**, v. 51, n. 3, p. 327-332, 2003.

SOKOLOV, Dmitriy N. et al. Anti-viral activity of (-)-and (+)-usnic acids and their derivatives against influenza virus A (H1N1) 2009. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 22, n. 23, p. 7060-7064, 2012.

STANLEY, Sarah A.; COX, Jeffery S. Host-pathogen interactions during Mycobacterium tuberculosis infections. In: **Pathogenesis of Mycobacterium tuberculosis and its Interaction with the Host Organism**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2013. p. 211-241.

SUSSMANN, Rodrigo AC et al. Intraerythrocytic stages of Plasmodium falciparum biosynthesize vitamin E. **FEBS letters**, v. 585, n. 24, p. 3985-3991, 2011.

SWANSON, Joel A.; WATTS, Colin. Macropinocytosis. **Trends in cell biology**, v. 5, n. 11, p. 424-428, 1995.

SZYMANOWSKI, Felipe et al. Endocytosis and intracellular traffic of cholesterol-PDMAEMA liposome complexes in human epithelial-like cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 156, p. 38-43, 2017.

TURNER, Patricia V. et al. Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 50, n. 5, p. 600-613, 2011.

TAKAI, Makoto; UEHARA, Yoshimasa; BEISLER, John A. Usnic acid derivatives as potential antineoplastic agents. **Journal of medicinal chemistry**, v. 22, n. 11, p. 1380-1384, 1979.

TIBERI, Simon et al. Tuberculosis: progress and advances in development of new drugs, treatment regimens, and host-directed therapies. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 7, p. e183-e198, 2018.

TISSOT, Bérangère et al. Interaction of fucoidan with the proteins of the complement classical pathway. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1651, n. 1-2, p. 5-16, 2003.

TORCHILIN, Vladimir. Multifunctional and stimuli-sensitive pharmaceutical nanocarriers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, n. 3, p. 431-444, 2009.

UPADHYAY, Tarun K. et al. Nano-Rifabutin entrapment within glucan microparticles enhances protection against intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, v. 47, n. 1, p. 427-435, 2019.

USOV, Anatolii I.; BILAN, Maria Ivanovna. Fucoidans—sulfated polysaccharides of brown algae. **Russian chemical reviews**, v. 78, n. 8, p. 785, 2009.

UTSKARPEN, Audrun et al. Shiga toxin increases formation of clathrin-coated pits through Syk kinase. **PLoS One**, v. 5, n. 7, 2010.

VIJAYAKUMAR, C. S. et al. Anti-inflammatory activity of (+)-usnic acid. **Fitoterapia**, v. 71, n. 5, p. 564-566, 2000.

VILELA-SILVA, Ana-Cristina ES et al. Sulfated fucans from the egg jellies of the closely related sea urchins *Strongylocentrotus droebachiensis* and *Strongylocentrotus pallidus* ensure species-specific fertilization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 1, p. 379-387, 2002.

VYAS, S. P.; SIHORKAR, Vaibhav; JAIN, Sanyog. Mannosylated liposomes for bio-film targeting. **International journal of pharmaceutics**, v. 330, n. 1-2, p. 6-13, 2007.

WANG, Feng et al. Doxorubicin-tethered responsive gold nanoparticles facilitate intracellular drug delivery for overcoming multidrug resistance in cancer cells. **ACS nano**, v. 5, n. 5, p. 3679-3692, 2011.

WASSERSUG, J. D. Pulmonary tuberculosis. **New England Journal of Medicine**, v. 235, n. 7, p. 220-229, 1946.

WEBER, S.; ZIMMER, A.; PARDEIKE, J. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for pulmonary application: a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 86, n. 1, p. 7-22, 2014.

WHO. The end TB strategy. Geneva (Switzerland): **World Health Organization**; 2014.

WIJAGKANALAN, Wassana et al. Intratracheally instilled mannosylated cationic liposome/NFκB decoy complexes for effective prevention of LPS-induced lung inflammation. **Journal of controlled release**, v. 149, n. 1, p. 42-50, 2011.

WOLFSON, Lara J. et al. Cost-effectiveness of adding bedaquiline to drug regimens for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis in the UK. **PLoS One**, v. 10, n. 3, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION; STOP TB INITIATIVE (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **Treatment of tuberculosis: guidelines**. World Health Organization, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis report 2013**. World Health Organization, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis report 2018**. World Health Organization; 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis report 2019**. World Health Organization; 2019.

WU, Shao-Jung et al. Delivery of berberine using chitosan/fucoidan-aurine conjugate nanoparticles for treatment of defective intestinal epithelial tight junction barrier. **Marine drugs**, v. 12, n. 11, p. 5677-5697, 2014.

XIONG, Meng-Hua et al. Delivery of antibiotics with polymeric particles. **Advanced drug delivery reviews**, v. 78, p. 63-76, 2014.

YAMAMOTO, Yoshikazu et al. Screening of tissue cultures and thalli of lichens and some of their active constituents for inhibition of tumor promoter-induced Epstein-Barr virus activation. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 43, n. 8, p. 1388-1390, 1995.

YANG, Nicole J.; HINNER, Marlon J. Getting across the cell membrane: an overview for small molecules, peptides, and proteins. In: **Site-Specific Protein Labeling**. Humana Press, New York, NY, 2015. p. 29-53.

YANG, Tae Won et al. Side effects associated with the treatment of multidrug-resistant tuberculosis at a tuberculosis referral hospital in South Korea: A retrospective study. **Medicine**, v. 96, n. 28, 2017.

YEZHELYEV, Maksym V. et al. Proton-sponge coated quantum dots for siRNA delivery and intracellular imaging. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 28, p. 9006-9012, 2008.

YOKOUCHI, Yusuke et al. (+)-Usnic acid-induced myocardial toxicity in rats. **Toxicologic pathology**, v. 43, n. 3, p. 424-434, 2015.

ZHANG, Hailong; MA, Yong; SUN, Xue-Long. Recent developments in carbohydrate-decorated targeted drug/gene delivery. **Medicinal research reviews**, v. 30, n. 2, p. 270-289, 2010.

ZHURISHKINA, Elena V. et al. The effect of polydisperse fucoidans from *Fucus vesiculosus* on Hep G2 and Chang liver cells. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 21, p. 100209, 2020.

ZUMLA, Alimuddin; NAHID, Payam; COLE, Stewart T. Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens. **Nature reviews Drug discovery**, v. 12, n. 5, p. 388-404, 2013.

APÊNDICE A - ARTIGO SUBMETIDO NA REVISTA *PHYTOCHEMISTRY REVIEWS*

Phytochemistry Reviews Usnic acid: From an ancient lichen derivative to promising biological and nanotechnology applications --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Usnic acid: From an ancient lichen derivative to promising biological and nanotechnology applications
Article Type:	Review Article
Keywords:	usnic acid; chemical and biological properties; mechanisms of action; nanotechnology.
Corresponding Author:	Mariane Lira-Nogueira, Ph.D Universidade Federal de Pernambuco Recife, Pernambuco BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidade Federal de Pernambuco
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Daniel Charles S Macedo
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Daniel Charles S Macedo
	Marcela Silvestre Outtes Wanderley, Ph.D
	Milena Sales Ferraz, Ph.D
	Noemia Pereira Silva Santos, Ph.D
	Ana Maria Q. López, Ph.D
	Nereide Stela Santos Magalhaes, Ph.D
	Mariane Lira-Nogueira, Ph.D
Order of Authors Secondary Information:	
Funding Information:	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
	Mr Daniel Charles S Macedo