



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
INSTITUTO KEIZO ASAMI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

JAQUELINE BARBOSA DE SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA CEFTAZIDIMA E ÁCIDO
ÚSNICO ENCAPSULADOS EM LIPOSSOMAS REVESTIDOS COM QUITOSANA
FRENTE A BACTÉRIAS QUE INDUZEM O CÂNCER COLORRETAL**

Recife
2022

JAQUELINE BARBOSA DE SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA CEFTAZIDIMA E ÁCIDO
ÚSNICO ENCAPSULADOS EM LIPOSSOMAS REVESTIDOS COM QUITOSANA
FRENTE A BACTÉRIAS QUE INDUZEM O CÂNCER COLORRETAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em inovação terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Inovação terapêutica. Área de concentração: Desenvolvimento Pré-clínico de Produtos Bioativos.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Carolina Accioly Brelaz

Coorientadora: Profa. Dra. Isabella Macário Ferro Cavalcanti

Recife

2022

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB4/1788

Souza, Jaqueline Barbosa de

Caracterização e avaliação da atividade da ceftazidima e ácido úsnico encapsulados em lipossomas revestidos com quitosana frente a bactérias que induzem o câncer colorretal / Jaqueline Barbosa de Souza. – 2022.

113 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Carolina Accioly Brelaz.

Coorientadora: Profa. Dra. Isabella Macário Ferro Cavalcanti.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2022.

Inclui referências e apêndices.

1. Reto - Câncer. 2. Polímeros. 3. Enterobactérias. I. Brelaz, Maria Carolina Accioly (orientadora). II. Cavalcanti, Isabella Macário Ferro (coorientadora). III. Título.

616.994

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022-153

JAQUELINE BARBOSA DE SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA CEFTAZIDIMA E ÁCIDO
ÚSNICO ENCAPSULADOS EM LIPOSSOMAS REVESTIDOS COM QUITOSANA
FRENTE A BACTÉRIAS QUE INDUZEM O CÂNCER COLORRETAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica. Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde

Aprovado em: 28/07/2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Valéria Pereira Hernandez (Examinadora Interna)
Instituto Aggeu Magalhães – Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof^a. Dr^a. Elisângela Afonso de Moura Kretzschmar (Examinadora Externa)
Universidade Estadual da Paraíba - UEPB

Prof. Dr. Elis Dionísio da Silva (Examinador Externo)
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado forças para chegar até aqui, pois somente Ele sabe as dificuldades que enfrentei para realização do meu sonho. Obrigada por todas as pessoas que o Senhor colocou no meu caminho que estimularam o meu crescimento e nunca desistiram de mim.

À minha mãe e à minha avó, por terem sido exemplos de força feminina, por terem me apoiado em todas as decisões da minha vida e especialmente por terem conseguido me criar apesar de todas as necessidades que passamos. Amo vocês incondicionalmente.

À minha irmã por ter sugerido o curso de farmácia, que eu não sabia que seria a minha paixão, por vibrar de felicidade com a aprovação no mestrado e por estar ao meu lado em todos os momentos.

À Maria Cleonice de Souza (*in memoriam*), por ter sido a primeira a me ajudar na escrita acadêmica, pelo apoio financeiro até o seu momento de óbito e ter-me estimulado a manter-me firme no meu curso. Amo você, mãezinha do meu coração.

À Profa. Dra. Isabella Macário Ferro Cavalcanti por permitir-me fazer parte do seu grupo de pesquisa, MICRONAT, por oportunizar-me de tantas maneiras diferentes o meu crescimento pessoal e acadêmico. Você é minha inspiração de força feminina no setor de pesquisa! Obrigada por tudo!

À Profa. Maria Carolina pelos conselhos, apoio acadêmico, por acreditar no projeto e aceitar a orientação antes mesmo de me conhecer. Você é um exemplo de profissionalismo e amor pelo que faz.

Ao grupo de pesquisa MICRONAT por ter sido minha casa nos últimos anos e aos colegas de jornada acadêmica André, Anndressa, Davi, Jeferson e Zion, pelos ensinamentos! Gratidão.

A Karen, Dayane e Daniel, meu G3 (ou G4?), por terem sido meu porto seguro durante a pós-graduação, grande parte dessa vitória é decorrente do apoio de vocês! Com toda certeza, vocês foram incríveis! Gratidão por passarem por minha vida e ensinarem-me lições valiosas.

A Isabel, Jeferson, Juliana, Taciana, Pierre, Diogo, Guilherme, Matheus, Tatiane, Mayara, Nilton, Gabriel, Maíra, Michelline, e tantos outros amigos que me acompanharam na minha vida, vocês são minha família aqui na Terra!

À Karen por ter sido uma amiga, confidente e conselheira desde quando nos conhecemos. És extremamente incrível! Amo você.

À Isabel, por ter sido muito mais do que uma amiga, mas uma irmã do coração. Gratidão por ter me prestado auxílio durante todos os perrengues no laboratório e adoecimentos. Não tenho palavras para expressar o tanto que eu amo você e o quanto eu quero você na minha vida até o fim dos meus dias.

Aos funcionários do Instituto Keizo Asami (iLIKA).

Um agradecimento especial à Alexandra Asanovna Elbakyan, por acreditar na ciência aberta e acessível a todos.

E a todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para minha formação.

RESUMO

O câncer colorretal (CCR) representa a terceira neoplasia mais prevalente no Brasil e no mundo. Dentre os vários agentes indutores do CCR, recentemente tem sido relatada a associação da bactéria *Escherichia coli*, que, através da produção da genotoxina colibactina, induz danos nos enterócitos e a produção de células de proliferação. Assim, uma estratégia terapêutica seria a terapia combinada entre produtos naturais como o ácido úsnico (AU), e antibióticos como a ceftazidima (CAZ). Os lipossomas são relatados como uma forma de veicular esses fármacos e sobrepor as limitações de sua administração. Além disso, a fim de viabilizar a administração desses lipossomas por via oral, esses nanocarreadores podem ser revestidos pela quitosana. Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver, caracterizar e avaliar a atividade antibacteriana e antibiofilme da CAZ e AU encapsulados em lipossomas revestidos com quitosana (Lipo-CAZ-Qui, Lipo-AU-Qui, Lipo-CAZ-AU-Qui e Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-Qui) frente a *E. coli* indutora de CCR. Inicialmente, os lipossomas foram preparados através do método de hidratação do filme lipídico seguido por sonicação e com revestimento com quitosana através da técnica *drop-wise*. Eles foram caracterizados quanto ao tamanho de partícula ($\emptyset$), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (ζ), pH e eficiência de encapsulação (%EE), além das caracterizações físico-químicas através de difração de raio X (DRX), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TGA). A estabilidade das formulações em dispersão foi avaliada por um período de 120 dias, assim como por 120 minutos em pH gastrointestinais simulados. A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) foram determinadas pelo método de microdiluição em caldo seguindo o protocolo do *Clinical and Laboratory Standards Institute* frente às cepas de *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* NCTC 13846 e *E. coli* H10407, enquanto os ensaios antibiofilme foram realizados pelo método de cristal violeta. Lipo-CAZ-Qui, Lipo-AU-Qui, Lipo-CAZ-AU-Qui e Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-Qui apresentaram $\emptyset$ entre $116,5 \pm 5,3$ e $240,3 \pm 3,5$ nm, PDI abaixo de 0,5, ζ entre $+16,4 \pm 0,6$ e $+28 \pm 0,8$ mV, pH entre 5 e 5,2, %EE de $51,5 \pm 0,2\%$ para a CAZ e $99,94 \pm 0,1\%$ para AU. Além disso, todos os lipossomas desenvolvidos se mostraram estáveis

em pH gástrico e intestinal simulados e por um período médio de 120 dias. As caracterizações por DRX, FTIR, DSC e TGA indicaram interações químicas entre os componentes da formulação, encapsulação dos fármacos e estabilidade térmica dos lipossomas. As análises microbiológicas de Lipo-CAZ-Qui e Lipo-AU-Qui demonstraram atividade antibacteriana, além de inibição da formação de biofilmes e do biofilme pré-formado de *E. coli*, contudo, as formulações Lipo-CAZ-AU-Qui e Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-Qui apresentaram potencialização nessas atividades em decorrência da coencapsulação ou a combinação das formulações. Portanto, os lipossomas apresentam características com a potencial para administração oral *in vivo*, em futuras aplicações na terapia antibacteriana e antibiofilme frente a bactérias indutoras de CCR. Futuros ensaios de farmacocinética e farmacodinâmica podem ser realizados a fim de elucidar qual das formulações tem melhor desempenho *in vivo*, bem como comprovar a eficácia do nanossistemas desenvolvidos.

Palavras-chave: Nanocarreadores lipídicos; Polímeros; Enterobactérias; Carcinogênese.

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) represents the third most prevalent neoplasm in Brazil and worldwide. Among the various agents inducing CRC, the association of the bacterium *Escherichia coli* has recently been reported, which, through the production of colibactin genotoxin, induces damage to enterocytes and the production of proliferating cells. Thus, a therapeutic strategy would be the combination therapy between natural products such as usnic acid (AU) and antibiotics such as ceftazidime (CAZ). Liposomes are reported as a way of delivering these drugs and overcoming the limitations of their administration. Furthermore, in order to facilitate the oral administration of these liposomes, these nanocarriers can be coated with chitosan. In this sense, the objective of the present work was to develop, characterize and evaluate the antibacterial and antibiofilm activity of CAZ e AU encapsulated in chitosan-coated liposomes (Lipo-CAZ-Qui, Lipo-AU-Qui, Lipo-CAZ-AU-Qui, and Lipo -CAZ-Qui + Lipo-AU-Qui) against CCR-inducing *E. coli*. Initially, the liposomes were prepared using the lipid film hydration method followed by sonication and coated with chitosan using the drop-wise technique. They were characterized in terms of particle size ($\emptyset$), polydispersity index (PDI), zeta potential (ζ), pH, and encapsulation efficiency (%EE), in addition to physicochemical characterizations through X-ray diffraction (XRD), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetry (TGA). The stability of the dispersion formulations was evaluated for a period of 120 days, as well as for 120 minutes in simulated gastrointestinal pH. The minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) were determined by the broth microdilution method following the protocol of the Clinical and Laboratory Standards Institute against strains of *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* NCTC 13846, and *E. coli* H10407, while the antibiofilm assays were performed by the crystal violet method. Lipo-CAZ-Qui, Lipo-AU-Qui, Lipo-CAZ-AU-Qui and Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-Qui presented $\emptyset$ between 116.5 ± 5.3 and 240.3 ± 3.5 nm, PDI below 0.5, ζ between $+16.4 \pm 0.6$ and $+28 \pm 0.8$ mV, pH between 5 and 5.2, %EE of $51.5 \pm 0.2\%$ for CAZ and $99.94 \pm 0.1\%$ for AU. In addition, all developed liposomes were stable in simulated gastric and intestinal pH and for an average period of 120 days. Characterizations by XRD, FTIR, DSC, and TGA indicated

chemical interactions between the components of the formulation, drug encapsulation, and thermal stability of the liposomes. The microbiological analyzes of Lipo-CAZ-Qui and Lipo-AU-Qui showed antibacterial activity, in addition to inhibiting the formation of biofilms and the preformed biofilm of *E. coli*. However, the formulations Lipo-CAZ-AU-Qui and Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-Qui showed potentiation in these activities as a result of coencapsulation or the combination of formulations. Therefore, liposomes have characteristics with the potential for oral administration *in vivo* in future applications in antibacterial and antibiofilm therapy against RCC-inducing bacteria. Future pharmacokinetic and pharmacodynamic assays can be performed in order to elucidate which of the formulations has the best performance *in vivo*, as well as to prove the efficacy of the developed nanosystems.

Keywords: Lipid nanocarriers; Polymers; Enterobacteriaceae; Carcinogenesis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Progressão do câncer colorretal	19
Figura 2 –	Associação da microbiota e o CCR	23
Figura 3 –	Atividade da carcinogênica da colibactina na mucosa intestinal	24
Figura 4 –	Mecanismo de ação da radioterapia	26
Figura 5 –	Atividades dos agentes quimioterápicos antineoplásicos em relação à fase do ciclo celular	29
Figura 6 –	Prevalência e distribuição de MSI-H pelo cólon	30
Figura 7 –	Estrutura química da cefalosporina C	32
Figura 8 –	Estrutura química da ceftazidima	33
Figura 9 –	Estrutura química do ácido úsnico	36
Figura 10 –	Enantiômeros do ácido úsnico	36
Figura 11 –	Farmacocinética de sistemas farmacêuticos convencionais em comparação com os sistemas de liberação controlada de fármacos	38
Figura 12 –	Processo de formação do lipossoma	42
Figura 13 –	Classificação do lipossoma com base no tamanho e lamelaridade	42
Figura 14 –	Características estruturais de lipossomas convencionais, furtivos, sítio-específicos e pH sensíveis	44
Figura 15 –	Estrutura química da quitosana	46
Figura 16 –	Representação de um lipossoma revestido com quitosana	47
Figura 17 –	Aspecto macroscópico de lipossomas com revestimento de quitosana	56
Figura 18 –	Espectros de FTIR dos lipossomas sem revestimento de quitosana e ácido úsnico	61
Figura 19 –	Espectros de FTIR dos lipossomas com revestimento de quitosana e quitosana	62
Figura 20 –	DRX dos lipossomas sem fármaco e sem quitosana e ácido úsnico	64
Figura 21 –	DRX dos lipossomas com o revestimento por quitosana e da quitosana	65
Figura 22 –	Termograma dos lipossomas sem quitosana, com ácido úsnico e com ceftazidima, e do ácido úsnico livre	66
Figura 23 –	Termograma dos lipossomas com o revestimento por quitosana, e da quitosana	68
Figura 24 –	Termograma dos lipossomas com o revestimento por quitosana, e da quitosana	69
Figura 25 –	DSC dos lipossomas com o revestimento por quitosana e da quitosana	70
Figura 26 –	Inibição da formação do biofilme de cepas de <i>Escherichia coli</i> H100407 após o tratamento a ceftazidima e ácido úsnico encapsulados em lipossomas revestidos com quitosana	85
Figura 27 –	Inibição do biofilme pré-formado por cepas de <i>Escherichia coli</i> H100407 após o tratamento com ceftazidima e ácido úsnico encapsulados em lipossomas revestidos com quitosana	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Sistemas de liberação controlada e suas principais aplicações biológicas	39
Tabela 2 –	Caracterização quanto ao tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, pH, teor e eficiência de encapsulação	55
Tabela 3 –	Estudo de estabilidade em pH gástrico simulado (pH 1,2) das dispersões	71
Tabela 4 –	Estudo de estabilidade em pH intestinal simulado (pH 6,8) das dispersões	73
Tabela 5 –	Estudo de estabilidade a 2 °C das dispersões	75
Tabela 6 –	Avaliação da atividade antibacteriana de CAZ, AU, Lipo-CAZ-Qui, Lipo-AU-Qui, LIPO-CAZ-AU-Qui e Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-Qui frente a <i>E. coli</i> ATCC 25922, <i>E. coli</i> NCTC 13846 e <i>E. coli</i> H10407	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%EE	Eficiência de encapsulação
5-FU	5-fluoracil
7-ACA	Ácido 7-aminocefalosporânico
ATCC	American Type Culture Collection
AU	Ácido úsnico
CAZ	Ceftazidima
CBM	Concentração bactericida mínima
CCR	Câncer colorretal
CIM	Concentração inibitória mínima
CLB	Genotoxina colibactina
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DRX	Difração de raios-x
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
FDA	Food and Drug Administration
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de fourier
INCA	Instituto Nacional de Câncer
Lipo-AU	Lipossoma sem o revestimento por quitosana encapsulando o ácido úsnico
Lipo-AU-Qui	Lipossoma revestido por quitosana encapsulando o ácido úsnico
Lipo-CAZ	Lipossoma sem o revestimento por quitosana encapsulando a ceftazidima
Lipo-CAZ-AU-Qui	Lipossoma revestido por quitosana coencapsulando a ceftazidima e o ácido úsnico
Lipo-CAZ-Qui	Lipossoma revestido por quitosana encapsulando a ceftazidima
Lipo-NQui	Lipossoma sem o revestimento por quitosana
Lipo-Qui	Lipossoma com o revestimento por quitosana
PDI	Índice de polidispersão
pKs	Policetídeo sintetase
Pool	Mistura de lipossomas revestidos por quitosana encapsulando separadamente o ácido úsnico e a ceftazidima
Qui	Quitosana
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SLCs	Sistemas de liberação controlada
SUS	Sistema Único de Saúde
TGA	Análises térmicas por termogravimetria

LISTA DE SÍMBOLOS

ζ	Potencial zeta
$\varnothing$	Tamanho de partícula
μm	Micrometro
%EE	Eficiência de encapsulação
μg	Micrograma
μL	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVO GERAL	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	19
3.1	CÂNCER COLORRETAL	19
3.2	MICROBIOTA INTESTINAL E CCR	21
3.3	TRATAMENTO CONVENCIONAL PARA O CCR	25
3.3.1	Radioterapia	25
3.3.2	Quimioterapia.....	27
3.3.3	Imunoterapia	29
3.4	CEFTAZIDIMA.....	31
3.5	TERAPIA COMBINADA E ÁCIDO ÚSNICO	34
3.6	NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA.....	37
3.7	LIPOSSOMAS	41
3.7.1	Lipossomas revestidos com quitosana.....	44
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
4.1	MATERIAIS	48
4.1.1	Fármacos e Reagentes.....	Erro! Indicador não definido.
4.1.2	Bactérias.....	Erro! Indicador não definido.
4.2	PREPARAÇÃO DOS LIPOSSOMAS COM O REVESTIMENTO DE QUITOSANA CONTENDO CAZ, AU e CAZ+AU	48
4.3	CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS.....	49
4.3.1	Tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e pH dos lipossomas	49
4.3.2	Determinação do teor e eficiência de encapsulação da ceftazidima em lipossomas	50
4.3.3	Determinação do teor e eficiência de encapsulação de ácido úsnico em lipossomas	50
4.3.4	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier e difração de raios-x dos lipossomas	51
4.3.5	Análises térmicas por termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial dos lipossomas	51
4.4	ESTABILIDADE DOS LIPOSSOMAS	52

4.4.1	Estabilidade dos lipossomas em condições de pH gastrointestinais simuladas	52
4.4.2	Estabilidade das dispersões lipossomais	52
4.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	52
4.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME	53
4.6.1	Determinação da concentração de inibição da formação do biofilme	53
4.6.2	Determinação da concentração de inibição do biofilme pré-formado	54
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS.....	55
5.1.1	Tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e pH dos lipossomas	55
5.1.2	Teor e eficiência de encapsulação de ceftazidima e ácido úsnico em lipossomas	59
5.1.3	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e difração de raios-x (DRX) dos lipossomas	60
5.1.4	Análises térmicas por termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial dos lipossomas	65
5.1.5	Estabilidade dos lipossomas em condições de pH gastrointestinais simuladas	71
5.1.6	Estabilidade das dispersões lipossomais	75
5.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	78
5.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME	83
5.3.1	Avaliação da inibição do biofilme	83
5.3.2	Avaliação da inibição do biofilme pré-formado	86
6	CONCLUSÃO	89
	REFERÊNCIAS	90
	APÊNDICE A: ARTIGO DE REVISÃO.....	112

1 INTRODUÇÃO

O câncer de cólon e reto, também denominado como câncer de intestino ou colorretal (CCR), é uma neoplasia que se desenvolve em regiões do intestino grosso. Esse câncer representa aproximadamente 10,2% dos índices de neoplasias em todo o mundo, e, de acordo com estimativas da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer, os índices de mortalidade estimados em 881 mil óbitos por ano (DURÃES *et al.*, 2020; WILD; WEIDERPASS; STEWART, 2020). No Brasil, de acordo com dados mais recentes obtidos na plataforma online do Instituto Nacional de Câncer (INCA), o CCR é a terceira neoplasia mais comum nos homens e segunda nas mulheres, e conforme descrito na estimativa de casos para 2020, serão diagnosticados 41.010 novos casos, sendo 20.540 nos homens e 20.470 casos nas mulheres. É o segundo tipo de câncer mais incidente e o terceiro que mais causa óbitos no Brasil (INCA, 2020).

As bactérias da microbiota intestinal podem estar relacionadas ao desenvolvimento de carcinogênese. Nesse sentido, a *Escherichia coli* é isolada frequentemente de pacientes com CCR e indivíduos saudáveis, entretanto, são encontradas cepas mais patogênicas em pacientes com CCR se comparadas com as cepas de pacientes saudáveis (BUTT *et al.*, 2021). *E. coli* faz parte da família Enterobacteriaceae, e é uma bactéria anaeróbica facultativa, Gram-negativa e móvel. Algumas cepas dessa bactéria, como as enterotoxigênicas, são produtores de biofilme, mediados pelo *locus tlb* para adesão e invasão celular, sendo este um importante fator de virulência no desenvolvimento da resistência a antibióticos, que, aumenta a aderência da *E. coli* aos tecidos provocando persistência das infecções (JULIE *et al.*, 2021).

Existem evidências que sugerem um modelo nomeado como “motorista-passageiro”, o qual aponta que bactérias, como cepas genotóxicas de *E. coli*, uma bactéria encontrada na microbiota intestinal, podem induzir um efeito citopático específico conhecido como megalocitose. Essa megalocitose acontece devido a uma ilha genômica específica, chamada de ilha de poliketide sintetase (pks), responsável pela expressão da genotoxina colibactina (clb). A clb induz quebras na dupla fita do DNA, ocasionando instabilidade cromossômica, parada do ciclo celular, acompanhada de secreção de mediadores inflamatórios e fatores de crescimento, promovendo, assim, a proliferação celular, fatores esses que contribuem de forma

significativa na carcinogênese do CCR (LUCAS *et al.*, 2020; MOHAMED *et al.*, 2021; SADECKI *et al.*, 2021).

Dessa forma, o desenvolvimento de estratégias terapêuticas se faz necessário a fim de evitar a iniciação e progressão do CCR causado por bactérias Gram-negativas, sendo a utilização de antibióticos uma proposta com potencial de aplicação (HATTORI *et al.*, 2019). Uma classe importante de antimicrobianos utilizada para o tratamento de infecções ocasionadas por bactérias Gram-negativas são as cefalosporinas. A ceftazidima (CAZ), cefalosporina de terceira geração, tem espectro de ação frente a *E. coli*. Entretanto, em decorrência da sua característica catiônica e sua alta polaridade, sua absorção é reduzida pelo trato gastrointestinal, resultando em uma baixa biodisponibilidade quando administrada por via oral (POGUE; BONOMO; KAYE, 2019; NGUYEN *et al.*, 2021).

Terapias combinadas representam uma alternativa no tratamento de doenças bacterianas, sendo empregadas com o objetivo de aumentar a potência e, por consequência, o sucesso terapêutico. Produtos naturais apresentam potencial de atuação em sinergia com medicamentos convencionalmente empregados na terapêutica, reduzindo assim a dose necessária para atingir o efeito desejado e ocasionando redução dos efeitos colaterais (VASCONCELOS *et al.*, 2020; MIETHKE *et al.*, 2021).

Nesse contexto, o ácido úsnico (AU) representa um dos compostos em potencial para esse objetivo. AU é um produto oriundo do metabolismo secundário de líquens, apresentando diversas atividades farmacológicas tais como antibacteriana, antiviral, antifúngica, antiinflamatória, analgésica, assim como potencial de inibição de biofilmes bacterianos (FERRAZ-CARVALHO *et al.*, 2016; COSTA *et al.*, 2020). Entretanto, apesar de promissor, o AU apresenta baixa solubilidade aquosa com a formação de agregados cristalinos, assim como hepatotoxicidade, dificultando sua aplicação na clínica (FRANCOLINI *et al.*, 2019; BATTISTA *et al.*, 2020).

Portanto, se faz necessário o desenvolvimento de uma alternativa que reduza o potencial tóxico da ceftazidima e do ácido úsnico, bem como o melhoramento de suas propriedades farmacológicas (AGHDAM *et al.*, 2019). Logo, uma alternativa viável, é a utilização de sistemas de liberação controlada (SLCs), pois esses sistemas possibilitam uma terapêutica eficiente e segura para a administração de fármacos, com a redução dos efeitos colaterais. Dentre os nanosistemas utilizados como SLCs os lipossomas se destacam (HERNANDEZ; SHUKLA, 2022).

Os lipossomas são definidos como vesículas aquosas circundadas por uma ou mais bicamada lipídica. Eles são biocompatíveis, biodegradáveis e possuem baixa toxicidade. Devido à sua natureza anfifílica, estes têm a capacidade de incorporar tanto fármacos hidrofílicos no seu compartimento aquoso, como hidrofóbicos na bicamada lipídica (WILLIAM *et al.*, 2020; MOKDAD *et al.*, 2022). Desta forma, a encapsulação de fármacos em lipossomas, protegem os mesmos da degradação fisiológica, como as causadas por intermédio de enzimas, soluções alcalinas, sais biliares, microbiota intestinal, radicais livres, oxidação e degradação (AJEESHKUMAR *et al.*, 2021). Contudo, os lipossomas são sensíveis ao pH estomacal, desta forma, quitosana é uma opção de molécula de revestimento para possibilitar sua utilização por via oral (ZHOU *et al.*, 2018; DONG *et al.*, 2022).

A quitosana é um polissacarídeo natural composto por glucosamina e N-acetil glucosamina, obtida por desacetilação parcial da quitina das conchas de crustáceos e insetos (ALAVI; HAERI; DADASHZADEH, 2017; COLINO *et al.*, 2022). A propriedade catiônica desse polissacarídeo é utilizada em virtude da bioadesão, biocompatibilidade e biodegradabilidade. Assim, o revestimento do lipossoma pela quitosana pode melhorar a absorção do fármaco no intestino através de uma administração via oral, além de aumentar a distribuição do fármaco nas células bacterianas. Até onde se sabe, esse é o primeiro trabalho que realizou a encapsulação da CAZ e AU em lipossomas revestidos com quitosana, sendo, assim, pioneiro na área (SENEL; YUKSEL, 2020; HAMED I *et al.*, 2022).

Portanto, o objetivo deste trabalho é desenvolver, caracterizar e avaliar a atividade antibacteriana da ceftazidima e ácido úsnico encapsulados em lipossomas revestidos com quitosana frente a bactérias que induzem o câncer colorretal. Assim, sugere-se que o sistema proposto pelo presente estudo, possa ser utilizado em pacientes com biópsia positiva para CCR, com a presença de *E. coli* pKs positiva, como pré-terapia antineoplásica, através de administração por via oral. Logo, o uso dessa estratégia terapêutica poderia proporcionar uma necessária inovação terapêutica para a prevenção de CCR.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar um sistema lipossomal revestido por quitosana encapsulando a ceftazidima e ácido úsnico revestidos com quitosana para avaliação da atividade antibacteriana e antibiofilme frente a bactérias que induzem o câncer colorretal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver lipossomas revestidos com quitosana encapsulando ceftazidima (Lipo-CAZ-Qui), ácido úsnico (Lipo-AU-Qui);
- Coencapsular ceftazidima e ácido úsnico em lipossomas revestidos com quitosana (Lipo-CAZ-AU-Qui);
- Caracterizar os Lipo-CAZ-Qui, Lipo-AU-Qui e Lipo-CAZ-AU-Qui;
- Avaliar a estabilidade das formulações em pH gastrointestinal simulados;
- Avaliar a estabilidade das formulações após armazenamento;
- Avaliar a atividade antibacteriana e antibiofilme dos Lipo-CAZ-Qui, Lipo-AU-Qui e Lipo-CAZ-AU-Qui;

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 CÂNCER COLORRETAL

Câncer colorretal (CCR), também nomeado como câncer de intestino e reto, representa uma das neoplasias malignas mais diagnosticadas em todo o mundo (BRAY; STEWART; WILD, 2014; DUDLEY et al., 2016). Mutações genéticas e instabilidade cromossômica estimulam a displasia e hiperplasia de células que compõem o epitélio do cólon. No ponto de vista genético, uma vez que as proteínas de reparo de incompatibilidade encontram-se ausentes ou disfuncionais, as etapas de correção de erros de inserção e deleção de nucleotídeos durante o processo de replicação do DNA são prejudicadas. Em grande parte dos casos, esses erros representam o evento inicial na carcinogênese, resultando, assim, no desenvolvimento do câncer (THOMAS; LEAL; OVERMAN, 2020; DU et al., 2021).

Nesse contexto, as células-tronco presentes na região da cripta das microvilosidades intestinais, passam por processos que impedem a apoptose celular, evoluindo para a formação de pólipos, adenocarcinomas e o câncer propriamente dito, que, posteriormente, são estimuladas a angiogênese na região tumoral e invasão de tecidos secundários dando início à metástase (Figura 1) (TJALSMA et al., 2012; CAVESTRO et al., 2018; FAROOQI et al., 2019). Particularmente, as metástases são significativamente altas em pacientes com CCR, sendo esta a principal causa de morte por esse tipo de câncer (HASSANZADEH; ARBABI; ROSTAMI, 2021).

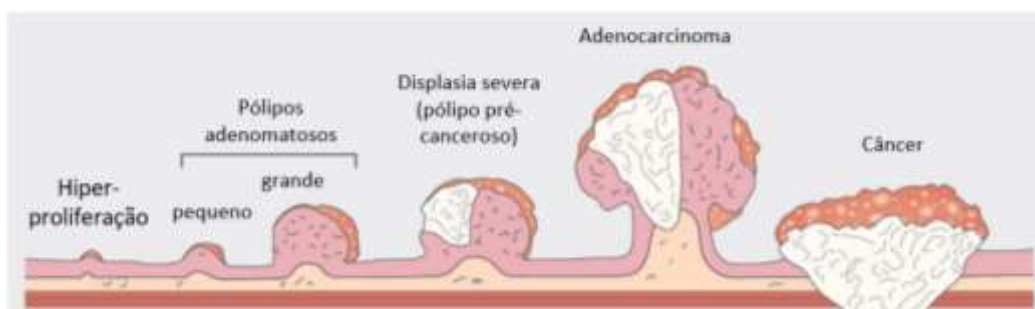


Figura 1. Progressão do câncer colorretal. Adaptado de: THRUMURTHY et al., 2016.

Alguns fatores são considerados de risco para o CCR, atribuídos, principalmente, ao “estilo de vida ocidental”, como a obesidade, etilismo, tabagismo e alto consumo de carne vermelha. Contudo, estes são completamente passíveis de modificação através do consumo de vegetais, frutas e fibras, assim como a prática de atividades físicas (DEKKER *et al.*, 2019; BÜRTIN; MULLINS; LINNEBACHER, 2020). Além dos fatores modificáveis, fatores genéticos estão fortemente relacionados com o desenvolvimento do CCR, onde mais de 5% são causadas por síndromes origem hereditária, tais como a polipose adenomatosa familiar e a síndrome de Lynch (JASPERSON *et al.*, 2010; BRAY *et al.*, 2018).

A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer, em 2020, estimou que este câncer seria diagnosticado em 1,8 milhão de pessoas em todo o mundo, com mortalidade aproximada de 881.000 (WILD; WEIDERPASS; STEWART, 2020). No Brasil, por sua vez, o Instituto Nacional do Câncer (INCA), estimou que, no mesmo ano, foram diagnosticados 41.010 novos casos, sendo, destes, 20.540 em pacientes do gênero masculino e 20.470 no feminino, representando o terceiro tipo mais diagnosticado em ambos os gêneros, ficando apenas atrás do câncer de próstata e mama feminina (INCA, 2020).

Apesar dos altos índices de detecção do CCR, a Organização Mundial da Saúde (OMS) aponta que as taxas de sobrevivência têm aumentado ao longo do tempo, especialmente em países desenvolvidos como a Austrália, Canadá, Reino Unido e Estados Unidos da América, através da incorporação de práticas preventivas, como a detecção precoce e estímulo de adoção de estilos de vida saudáveis (WCRF, 2018). Enquanto isso, em países subdesenvolvidos como a Tailândia, Turquia, Costa Rica, Equador e Brasil, há um aumento na incidência, especialmente atribuídos à má distribuição de renda e deficiências evidenciadas nos serviços de saúde (FOREMAN *et al.*, 2018).

O CCR, no entanto, continua ainda financeiramente oneroso, com custos anuais estimados em valores superiores a US \$ 18 bilhões, afligindo de forma desproporcional os diversos países. Os valores individuais que incluem os custos ambulatoriais e terapêuticos, nos EUA, variam de US \$ 8.125 a US \$ 328.601 mil, onde a variação é baseada de acordo com a escolha terapêutica a ser realizada, assim como a necessidade de intervenções cirúrgicas (DEGELING *et al.*, 2020; TRAN *et al.*, 2021). No Brasil, o contexto não é diferente, segundo os últimos dados liberados pelo

Ministério da Saúde, o tratamento cirúrgico e ambulatorial em média para os pacientes diagnosticados com CCR no estadiamento I é de R\$ 4.033,24 e pode chegar a R\$ 78.970,21 com quimioterapia e radioterapia no estadiamento III (OO, 2016).

Além dos fortes impactos econômicos para os serviços de saúde e sistemas de saúde, como o Sistema Único de Saúde (SUS) no Brasil, a descoberta de um câncer repercute de forma negativa no paciente (UYL-DE GROOT *et al.*, 2018). Com a progressão do câncer, todo o estado de saúde do paciente é alterado, uma vez que são utilizadas abordagens terapêuticas que produzem diversos efeitos colaterais, e, além disso, os desgastes a nível de saúde mental são frequentemente relatados, especialmente os relativos ao sentimento de morte iminente – já que a sobrevida média varia de 1,21 a 9,38 anos (CHU *et al.*, 2019; MCGEECHAN *et al.*, 2021).

Os fatores que estão associados ao desenvolvimento e progressão do CCR são amplamente estudados, onde duas grandes classificações são sugeridas como as principais: I) associado à colite, sendo este sempre relacionado com a doença inflamatória intestinal, e II) esporádico, que não apresenta correlação hereditária, atribuído aos fatores indutores ambientais, tais como tabagismo, obesidade e alimentação pobre em fibras (GAO *et al.*, 2017; ZOU; FANG; LEE, 2018).

Mais recentemente, estudos relataram a associação de microrganismos da microbiota intestinal como agentes na iniciação, desenvolvimento e/ou progressão do CCR (HELMINK *et al.*, 2019).

3.2 MICROBIOTA INTESTINAL E CCR

A microbiota humana, em um estado de saúde, consiste em mais de 30 trilhões de microrganismos, incluindo vírus, leveduras e bactérias, assim estes representam cerca de até 3% do nosso peso corporal. No trato intestinal isso não é diferente, diversas comunidades microbianas se encontram nesse local, os quais abrigam genes responsáveis pela codificação de diversas enzimas e metabólitos, que apresentam papel fundamental na digestão e absorção de nutrientes da dieta (RUAN *et al.*, 2020).

Estudos indicam que bactérias dos gêneros *Streptococcus*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Escherichia*, *Klebsiella* e *Citrobacter* são abundantes e

comuns na região que compreende o duodeno, jejuno e íleo (SHETTY *et al.*, 2017). Vasapolli e colaboradores (2019) descreveram que a região do duodeno abriga gêneros semelhantes ao observado no estômago, com a prevalência de *Enterobacteriaceae*, *Leptorichiaeceae*, *Veillonellaceae* e *Pseudomonadaceae*, enquanto no íleo a composição é semelhante a do cólon, apresentando *Clostridiaceae*, *Lachnospiraceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Ruminococcaceae*, *Enterobacteriaceae* e *Bacteroidaceae*.

No cólon, os filos bacterianos presentes são *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia*, *Proteobacteria* e *Actinobacteria*, com diferenças pouco relevantes ao longo da sua extensão. A diferença principal entre o intestino delgado e grosso refere-se à camada de muco, a qual exclui fisicamente algumas bactérias e contém mais células imunológicas. Apesar disso, microrganismos capazes de utilizar mucina como *Akkermansia*, *Ruminococcus* e algumas espécies de *Bacteroides* conseguem se multiplicar nesse ambiente (HALL *et al.*, 2017; SHETTY *et al.*, 2017).

Em um estado normal de saúde do indivíduo, a barreira produzida pela mucosa intestinal é íntegra, e, com isso, separa a microbiota das células do sistema imune. Contudo, em um estado patológico, esta barreira é rompida, favorecendo, assim, o surgimento de doenças intestinais como o CCR (ALHINAI *et al.*, 2019). Assim, alguns metabólitos e toxinas produzidas por esses agentes desempenham papel fundamental no desenvolvimento do CCR, já que interagem com o metabolismo, imunidade e integridade dos enterócitos (Figura 2) (SAUS *et al.*, 2019).

No ponto de vista imunológico, após a colonização dos enterócitos por bactérias da microbiota, é desenvolvido um estado de disbiose, que pode ser definida como a ruptura da homeostase causada por um desequilíbrio da microbiota intestinal. A disbiose estimula a produção de interleucinas como a IL-17A, IL-6, IL-8 e IL-22, que induzem a proliferação de células neoplásicas por meio da ativação secundária do fator nuclear κB , e, assim auxiliam na iniciação do CCR (ZACKULAR *et al.*, 2013; SONG *et al.*, 2018).

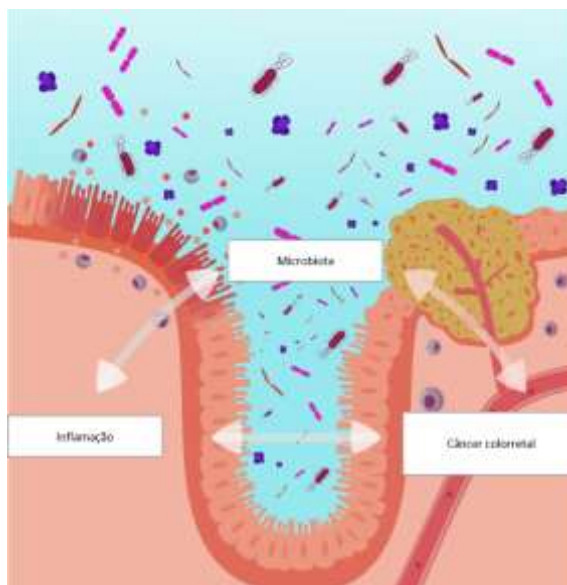


Figura 2. Associação da microbiota e o CCR. Fonte: Adaptado de SOUZA; BRELAZ-DE-CASTRO; CAVALCANTI, 2022.

Nesse contexto, é descrito que diversas espécies bacterianas são frequentemente isoladas de biópsias de pacientes com CCR, tais como *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides fragilis* e cepas de *Escherichia coli*. Algumas das justificativas que associam esses microrganismos ao CCR são a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e toxinas, que ocasionam danos na barreira epitelial, induzem a inflamação, e, por consequência, danos aos enterócitos (SONG *et al.*, 2018; SAUS *et al.*, 2019).

E. coli é descrita como uma das espécies mais identificadas em indivíduos com CCR. E, ainda que esta normalmente apresente características comensais, a partir da década de 1940 foram relatados o surgimento de cepas patogênicas, responsáveis pelo desenvolvimento de infecções intestinais e extra-intestinais, assim como foi sugerida a sua associação com o CCR (JIN *et al.*, 2016; TANG *et al.*, 2020).

Estudos filogenéticos indicaram que *E. coli* pode ser subdividida em quatro grupos, A, B, B2 e D, contudo, apenas cepas do grupo B2 abriga um operon sintase de peptídeo não ribossômico, poliketídeo híbrido (pKs), de 54 kb, responsável pela produção da genotoxina colibactina. Relata-se que as cepas pKs+ estão presentes em cerca de 20% dos indivíduos categorizados como saudáveis, 40% dos com doença inflamatória intestinal e 67% dos com CCR (BUC *et al.*, 2013; BOSSUET-GREIF *et al.*, 2018; DEJEA *et al.*, 2018).

Uma vez secretada, a colibactina exerce um efeito citotóxico frente aos enterócitos dos hospedeiros. Esse efeito ativa a via de sinalização, causando danos no DNA através de quebras de cadeias duplas, produção de espécies reativas de oxigênio, que, posteriormente, levam à parada do ciclo celular, seguida pela morte celular, desempenhando um papel significativo no CCR (Figura 3) (BABAEI *et al.*, 2020; IYADORAI *et al.*, 2020).

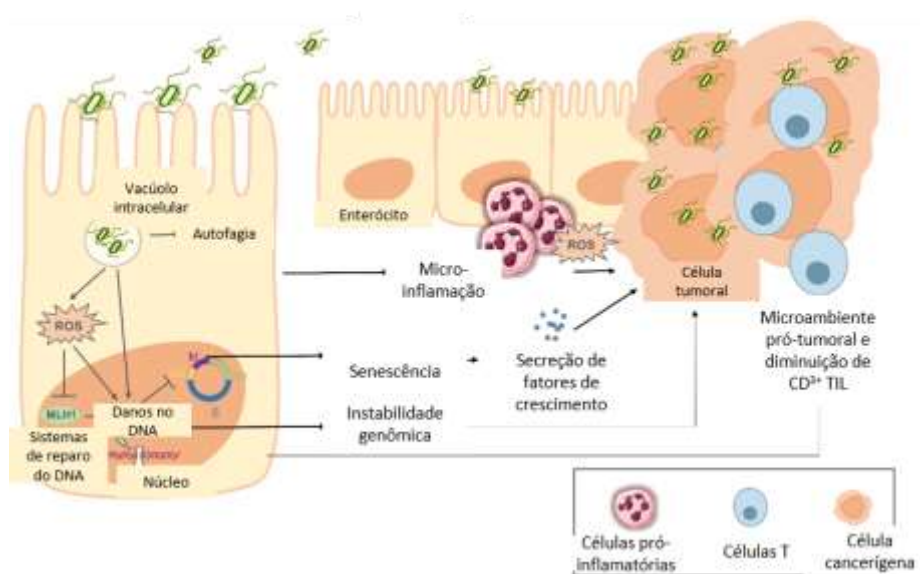


Figura 3. Atividade da carcinogênica da colibactina na mucosa intestinal. Fonte: Adaptado de JULIE *et al.*, 2021.

Além do efeito genotóxico da colibactina, essas bactérias induzem a senescência celular, através da produção de fatores de crescimento, que acarretam crescimento tumoral e secreção de mediadores inflamatórios que promovem a proliferação de células adjacentes (LOPÈS *et al.*, 2020). Também é possível que o microambiente imunológico da região tumoral seja afetado, através da redução de células T CD3⁺ (JULIE *et al.*, 2021).

Propõe-se, também, que os biofilmes produzidos por *E. coli*, que representam associações de bactérias revestidos por uma matriz de exopolissacarídeo, exibem potencial de invadir a camada mucosa do cólon, formando ambientes favoráveis para o desenvolvimento de bactérias, que em associação possam conduzir o estágio inicial e a progressão da carcinogênese (DREWES *et al.*, 2017; MIRZAEI *et al.*, 2020).

Contudo, as abordagens atuais para o tratamento do CCR consideram apenas as terapias convencionais, como a radioterapia, quimioterapia e imunoterapia (XIE; CHEN; FANG, 2020).

3.3 TRATAMENTO CONVENCIONAL PARA O CCR

Tendo como base os avanços crescentes na terapia contra o câncer, o tempo de sobrevida tem aumentado consideravelmente. Dessa forma, no CCR, a primeira abordagem consiste na remoção, por meio de cirurgia, dos tumores que estão localizados em toda a extensão do intestino, podendo também ser aplicada às metástases (DEJEA *et al.*, 2018; XIE; CHEN; FANG, 2020).

Cerca de 25% dos indivíduos acometidos com CCR apresentam focos de metástase no momento da admissão no serviço hospitalar, contudo, apenas 15% permanecem vivos após 5 anos da remissão tumoral. Assim, podem ser utilizadas alternativas que possam evitar o crescimento e a disseminação para outros tecidos, onde a quimioterapia, radioterapia e imunoterapia são amplamente aplicadas para esses fins (ZHAO *et al.*, 2017; JINGU *et al.*, 2018; SVEEN, KOPETZ, LOTHE, 2020).

3.3.1 Radioterapia

A radioterapia consiste em uma das principais e mais antiga abordagem para remissão do tumor de CCR, sendo empregada com ou sem associação de quimioterapia e radioterapia, aplicada em até 50% dos pacientes com diagnóstico positivo para essa neoplasia. Nessa técnica são empregados fótons de alta energia, com partículas carregadas com prótons e íons de carbono, dotados de capacidade de penetração nas células neoplásicas, induzindo à morte celular. A partir de sua utilização são induzidos danos acelerados ao DNA e a produção de radicais livres (RUYSSCHER *et al.*, 2019).

De modo geral, seu mecanismo de ação é dividido em duas grandes categorias, sendo elas: I) Ação direta, onde a ionização absorvida causa perda de elétrons, induzindo, assim, a quebra de ligação e induzindo mudanças funcionais em DNA, proteínas e outras macromoléculas celulares; e II) Ação indireta, cuja energia

emitida interage com a água presente nas células, que após ionização produzem radicais livres (Figura 4) (SREEDHAR *et al.*, 2013; HOSOYA; MIYAGAWA, 2014; DOWLATH *et al.*, 2021).

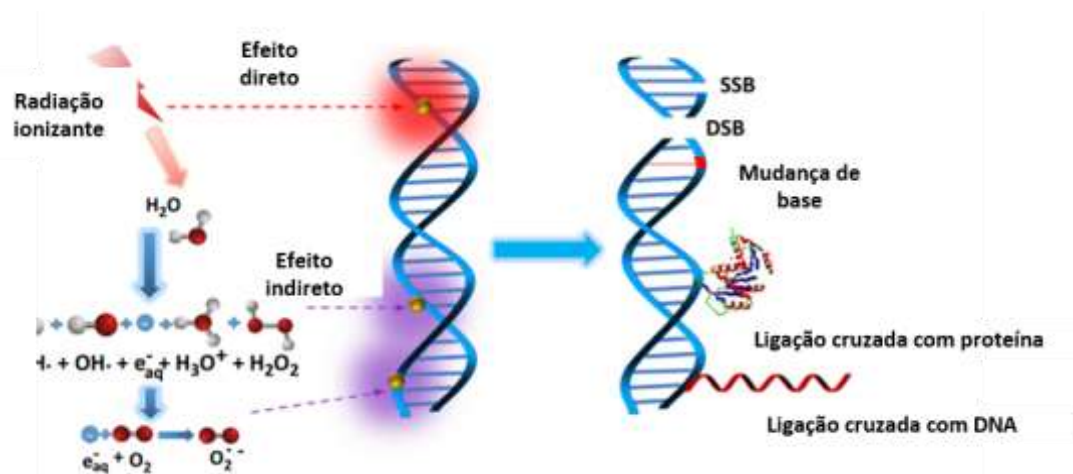


Figura 4. Mecanismo de ação da radioterapia. A radiação ionizante empregada na radioterapia danifica diretamente o DNA e também danifica o DNA por efeitos indiretos clivando as moléculas de água para gerar espécies reativas de oxigênio (ROS), e então, estes danificam o DNA. Fonte: Adaptado de WANG *et al.*, 2018.

No passado, a sua utilização era restrita ao tratamento pré-cirúrgico, uma vez que reduzindo o volume tumoral haveria maior facilidade para sua remoção cirúrgica. Porém, por volta dos anos 2000, a mesma passou a ser empregada como adjuvante no pós-cirúrgico, pois estudos indicaram que houve um aumento de até 38% da sobrevida do paciente (TORRE *et al.*, 2015; HÄFNER; DEBUS, 2016).

A partir disso, novas estratégias foram desenvolvidas a fim de aumentar a sua eficácia e ocasionar redução potencial da sua toxicidade. Para isso, foram utilizadas técnicas de contato como a braquiterapia endorretal e estereotáxica corporal, e, a mais atualmente, técnicas de conformação tridimensional (DRÖGE *et al.*, 2015; RIJKMANS *et al.*, 2017; ITO *et al.*, 2020).

A braquiterapia endorretal é a modalidade que a radiação é aplicada de forma direta no tumor através da introdução direta na cavidade afetada, cuja utilização se dá em virtude da permissibilidade a uma maior penetração de dose e passível de utilização em tumores com maiores extensões, independente do estadiamento

(RIJKMANS *et al.*, 2017). A estereotática corporal, por sua vez, é exclusiva para tumores recorrentes localizados na pelve, possuindo, também, capacidade de aplicação de altas doses (DAGOGLU *et al.*, 2015).

Por fim, a modalidade mais atual e amplamente aplicada é a de conformação tridimensional, uma vez que esta possibilita localizar o sítio tumoral e realizar diversas análises com o propósito de avaliar qual a melhor dose a ser empregada, por intermédio de análises de planejamento 3D e histogramas volume/dose (TAM; WU, 2019). Nesse sentido, é possível que sejam preservados órgão e tecidos saudáveis situados nas imediações do tumor (DRÖGE *et al.*, 2015). Todavia, apesar da sua ampla utilização na prática clínica relacionada ao CCR, é inegável a toxicidade dessa modalidade, visto que são comuns relatos de efeitos colaterais como sensibilização da pele e esfíncter anal e do trato urinário, danos hematológicos, dispareunia e secura vaginal (KULU *et al.*, 2016; ITO *et al.*, 2020).

Ainda que existam poucos estudos que fundamentem de forma concreta a relação observada entre a microbiota intestinal e a radioterapia, considera-se que a presença dos efeitos colaterais possa levar a danos no tecido intestinal, expondo os microrganismos aos tecidos e aumentando a resposta inflamatória, a soma desses fatores podem levar a formação de um novo sítio tumoral (FERREIRA *et al.*, 2014; KAŻMIERCZAK-SIEDLECKA *et al.*, 2020).

3.3.2 Quimioterapia

Os quimioterápicos representam os medicamentos que atuam como antineoplásicos, que geralmente exercem interferências no ciclo de multiplicação celular, com mecanismos de ação diversos, contudo os mais comuns são os de inibição da mitose e replicação do DNA, bem como atuação direta como agente citotóxico (SVEEN, KOPETZ, LOTHE, 2020). Os objetivos gerais de sua utilização são reduzir o risco de recorrência local, reduzir o tumor ou, ainda, aumentar a possibilidade de remoção cirúrgica, a fim de prolongar a sobrevida dos pacientes (ZANG *et al.*, 2017; SUO *et al.*, 2021).

Nesse sentido, os medicamentos atualmente empregados na terapia do CCR são os derivados da platina (oxaplatina), antimetabólitos (5-fluoracil; 5-FU) e inibidores da topoisomerase (irinotecan) (Figura 5) (IVESON *et al.*, 2018). As diretrizes atuais preconizam a infusão intravenosa de 5-FU + leucovorina (LV), capecitabina e oxiplatina (XELOX) ou, ainda, oxaplatina, 5-FU e LV (FOLFOX), como tratamentos de primeira linha, uma vez que foi demonstrado aumento da eficácia terapêutica e aumento da sobrevida global em até 14,7 meses (ZHANG *et al.*, 2017; PIAWAH, VENOOK, 2019).

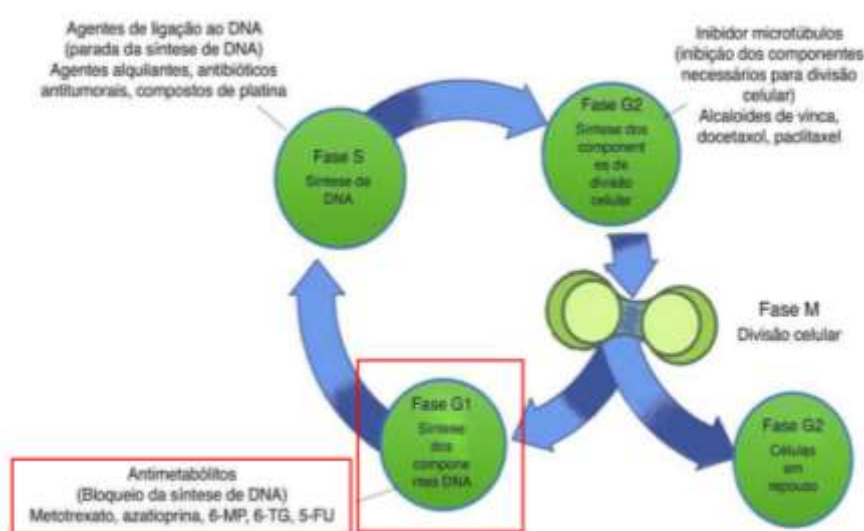


Figura 5. Atividades dos agentes quimioterápicos antineoplásicos em relação à fase do ciclo celular. Em destaque o mecanismo de ação de antimetabólitos como o 5-FU. Fonte: GUERREIRO *et al.*, 2015.

Contudo, as escolhas terapêuticas são realizadas de modo em que todo o estado de saúde do paciente seja avaliado, isto é, os exames clínicos e achados laboratoriais, dada a toxicidade de sua utilização. Além dos efeitos tóxicos, a quimioterapia, ainda está associada à baixa eficácia terapêutica, resistência e, ainda, baixa seletividade local-específica (KAFATOS *et al.*, 2017; JANES *et al.*, 2018).

Os efeitos antitumorais de agentes quimioterápicos como 5-FU e oxiplatina podem ser modificados por ação da microbiota intestinal, incluindo alterações no metabolismo, degradação enzimática, aumento da toxicidade e resistência, interferindo diretamente na eficácia terapêutica, implicando no prognóstico do

paciente em tratamento antineoplásico (GELLER *et al.*, 2017; YU *et al.*, 2017; YIXIA *et al.*, 2020). Portanto, considerar a microbiota como um local de intervenção terapêutica, pode melhorar a evolução dos pacientes com CCR durante a quimioterapia (TIWARI *et al.*, 2018).

3.3.3 Imunoterapia

Frente as limitações observadas nos regimes terapêuticos convencionais, como a radioterapia e a quimioterapia para CCR com presença de metástase e recidivas, as pesquisas evoluíram para desenvolvimento de alternativas que pudessem apresentar ampliação na seletividade e eficácia terapêutica (LEE; TAN; OON, 2018). Assim sendo, a indústria farmacêutica através das técnicas de biotecnologia, desenvolveram os anticorpos monoclonais (XIE; CHEN; FANG, 2020).

Esses agentes atuam especificamente nas células tumorais, por meio de mecanismos que incluem a inibição da proliferação, migração e diferenciação celular, sendo sua distribuição facilitada através dos vasos sanguíneos desenvolvidos no processo de angiogênese tumoral, assim como pela interação com as células do sistema imunológico (TIWARI *et al.*, 2018).

Contudo, essa escolha terapêutica é apenas aprovada para pacientes cujo tumor tem por caracterização o fenótipo de alta instabilidade de microssatélites (MSI-H), que representam sequências de DNA repetidas as quais estão espalhadas por todo o genoma (ASHKTORAB *et al.*, 2016; VIALE *et al.*, 2017; TEMRAZ *et al.*, 2019). Assim, estas desenvolvem mutações somáticas cumulativas, que resultam em prejuízos no reparo de incompatibilidade de DNA. A frequência de MSI-H é de até 20% dos pacientes com CCR e 5% no CCR metastático. A Figura 6 ilustra as porcentagens de prevalência de acordo com a localização do tumor no intestino (WIECZORSKA; STOLAREK; STEC, 2020).

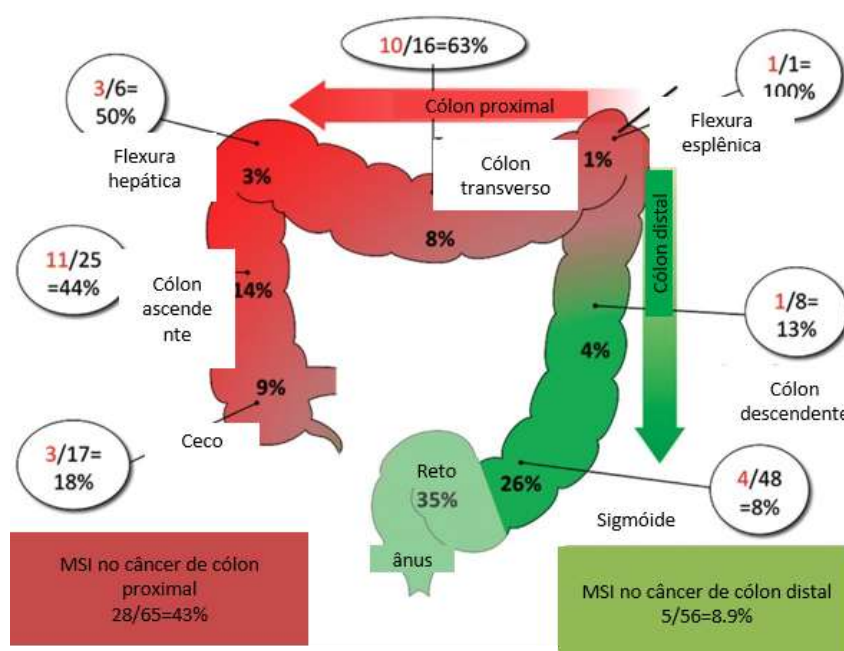


Figura 6. Prevalência e distribuição de MSI-H pelo cólon. Fonte: Adaptado de SØREIDE, 2011.

O imunoterápico considerado pioneiro para o tratamento do CCR foi o cetuximabe, aprovado em 2004 pelo *Food and Drug Administration* (FDA), e, posteriormente o bevacizumabe também aprovado pelo mesmo órgão. Para fins de escolha terapêutica, o bevacizumabe é considerado de primeira escolha e o cetuximabe de segunda para pacientes com CCR metastático (LEE; TAN; OON, 2018).

O bevacizumabe tem como mecanismo de ação impedimento na ligação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em seu receptor, impossibilitando o crescimento e propagação da metástase, sendo empregado em combinação com o 5-FU-LV (HURWITZ *et al.*, 2004; PARIKH *et al.*, 2019). Já o mecanismo de ação do cetuximabe ocorre através da ligação com o receptor de fator de crescimento epitelial (EGCRF), regulando, assim, o crescimento e a proliferação celular, utilizado como segunda linha em associação com o esquema terapêutico IFL (Irinotecano + 5-Fluorouracil + Leucovorin) (VECCHIONE *et al.*, 2011; ROSKOSKI, 2019).

Apesar dos dois terem sido pioneiros na imunoterapia, o FDA tem aprovado outros agentes para compor o elenco de anticorpos monoclonais no CCR, tais como

o panitumumabe (VAN CUTSEM *et al.*, 2007), aflibercepte (TANG *et al.*, 2012), regorafenibe (GROTHEY *et al.*, 2013), ramucirumabe (TABERNERO *et al.*, 2015), pembrolizumabe (O'NEIL *et al.*, 2017), nivolumabe (OVERMAN *et al.*, 2017) e ipilimumabe (LENZ *et al.*, 2018).

Apesar do êxito na terapia convencional para o CCR, diversos estudos sugerem que bactérias intestinais capazes de formar biofilme e liberar toxinas, além de induzirem respostas inflamatórias, podem ser utilizadas como alvo farmacológico para terapia do CCR (SAUS *et al.*, 2019). Assim, alternativas que fogem da convencionalidade, quimioterapia, radioterapia e imunoterapia, têm sido usadas analisando fatores que não se relacionam diretamente à biologia molecular do tumor (FAVORITI *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2019; IMAI *et al.*, 2020).

3.4 CEFTAZIDIMA

A disbiose é um dos fatores de risco para o CCR e utilizar antibióticos pode ser útil para reverter esse problema, representando uma provável alternativa preventiva e de tratamento dessa doença (PRABAHAR *et al.*, 2017). Portanto, antibióticos consistem em compostos, que podem ser derivados de produtos naturais ou sintetizados em laboratório, dotados de capacidade de inibir ou levar a morte de bactérias, cuja aplicação clínica se dá na erradicação dos agentes causadores de infecções (HATTORI *et al.*, 2019).

No início da década de 1970 os antibióticos começaram a ser utilizados como medicamentos profiláticos focados em infecções pós-cirúrgicas para ressecção tumoral (CONDON *et al.*, 1983; KIRAN *et al.*, 2015). Contudo, nos últimos anos, têm se aumentado o interesse em associar esses agentes como pré-terapia antineoplásica, ou durante o curso terapêutico, a fim de erradicar as bactérias que possam causar danos, ou ainda, que auxiliem na iniciação e progressão de um novo foco tumoral (SHIELDS *et al.*, 2019; FONG *et al.*, 2020).

Nesse contexto, antibióticos como as cefalosporinas surgem como um dos agentes que podem ser utilizados com esse propósito, representando umas das classes mais prescritas em todo o mundo. Estes antibióticos foram isolados a partir

de culturas de *Cephalosporium acremonium* em 1948, pelo cientista Giuseppe Brotzu. Do ponto de vista químico, elas são derivadas do ácido aminocefalospórico, com estrutura e funcionalidade semelhantes ao observado nas aminopenicilinas em virtude da presença do ácido 7-aminocefalosporânico (7-ACA) como núcleo central. Ademais, estas são constituídas por dois anéis, sendo um o β -lactâmico e o outro a dihidrotiazina (Figura 7) (SHAHBAZ, 2017).

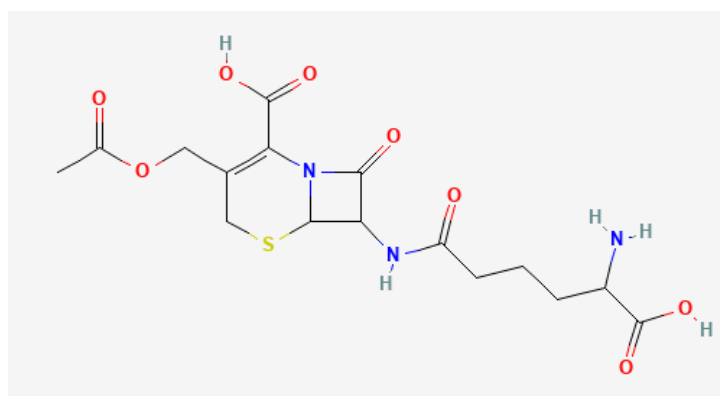


Figura 7. Estrutura química da cefalosporina C. Fonte: PUBCHEM, 2022.

São subdivididas de acordo com as gerações sendo: I) primeira geração-cefazolina, cefalotina e cefalexina; II) segunda geração-cefoxitina e cefotetan; III) terceira geração – ceftazidima, e cefotaxima; IV) quarta geração – cefepima; e V) quinta geração – ceftobiprol e ceftarolina (MEHTA; SHARMA; 2016; HASHIM *et al.*, 2020).

As cefalosporinas exibem atividade frente a bactérias Gram-positivas, além disso, demonstram atividade moderada frente as Gram-negativas, sendo utilizadas como alternativas para tratamento de bactérias resistentes e pacientes que são alérgicos a penicilina (SHAHBAZ *et al.*, 2017). O mecanismo de ação é o mesmo observado nas penicilinas, ou seja, causam alterações na síntese de peptidoglicano, componente estrutural da parede celular bacteriana, por meio da ligação às proteínas de ligação à penicilina, levando à morte bacteriana (CHOI; MCCARTHY, 2018).

Considerando o espectro de ação, a ceftazidima (CAZ) (Figura 8), introduzida na prática clínica no início da década de 1980, representa uma das escolhas terapêuticas para o tratamento de infecções ocasionadas por microrganismos Gram-negativos, com perfil de ação, inclusive, frente aos resistentes à primeira e segunda gerações (SHIRLEY, 2018). O perfil de tolerância à ceftazidima o torna uma opção útil para pacientes em estado grave, como os acometidos com CCR, e com risco de desenvolver eventos adversos a outros antibacterianos (MAHMOUDI *et al.*, 2020; KARAIKOS *et al.*, 2021).

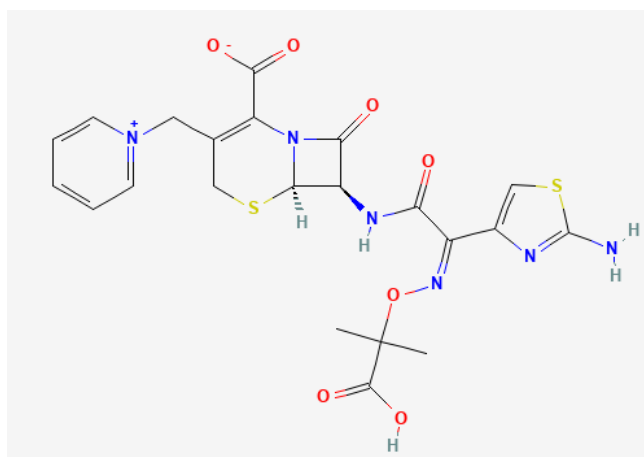


Figura 8. Estrutura química da ceftazidima. Fonte: PUBCHEM, 2022.

No ponto de vista estrutural, a CAZ pode ser denominada como uma cefalosporina aminotiazol, e, assim como outros agentes do mesmo grupo de terceira geração, cuja substituição da cadeia lateral na posição 7 é responsável por conferir incremento na estabilidade frente a hidrólise promovida pela β -lactamase, e, em conjunto com a presença do grupo 2-carboxi-2 oxipropano imino, aumentam significativamente a atividade frente a microrganismos Gram-negativos, como a *E. coli* (STERNBACH *et al.*, 2018).

O seu perfil farmacocinético é semelhante aos outros agentes de terceira geração. Assim, o tempo de meia vida é de 1,8 horas, sendo este parâmetro superior ao observado na cefotaxima, com taxas de ligação às proteínas plasmáticas de 5 a 22,8% independente da concentração (DAIKOS *et al.*, 2021). Sua excreção é

realizada através de filtração glomerular, sendo, então, eliminada de forma inalterada na urina, com depuração em indivíduos saudáveis de 72 a 141 mL/min (RAINS; BRYSON; PETERS, 1995; CHEN *et al.*, 2020).

A atividade antibacteriana da CAZ não aumenta conforme a concentração do fármaco aumenta, ou seja, taxas máximas de morte bacteriana ocorrem em concentrações de até cerca de 4 vezes a concentração inibitória mínima (CIM) – sendo esta a concentração necessária para atingir tecidos infectados. Assim, este fármaco é categorizado como um antibiótico não dependente de concentração (JONES *et al.*, 2019).

Nesse contexto, geralmente a CAZ é bem tolerada e os efeitos colaterais mais comumente relatados são erupções cutâneas, febre, eosinofilia, elevação dos testes de função hepática e alterações na função renal (FERRO *et al.*, 2019). Contudo, apesar da eficácia de sua utilização, uma das grandes dificuldades na sua aplicação são as vias de administração exclusivamente intravenosa ou intramuscular, já que sofre degradação no estômago devido ao pH baixo da região, com a formação de produtos de degradação tóxicos como a piridina, etanal e um $-\Delta^2$ isômero de CAZ (ARSÈNE *et al.*, 2002; NGUYEN *et al.*, 2021).

3.5 TERAPIA COMBINADA E ÁCIDO ÚSNICO

Medicamentos antibióticos devem seguir dois grandes critérios: I) Atender aos critérios de especificidade bacteriana, possuírem eficácia e segurança significativas capazes de induzir a morte bacteriana, e, por consequência curar o indivíduo acometido pela infecção, e II) Não serem suscetíveis à perda de eficácia, relacionados à evolução bacteriana como o exibido pelas β -lactamases (LAXMINARAYAN *et al.*, 2013; PHAM *et al.*, 2019). Esse perfil direcionou a indústria farmacêutica por mais de seis décadas no desenvolvimento de novos medicamentos, contudo, devido ao uso irracional desses medicamentos e a resistência emergente de cepas bacterianas, a identificação de novos compostos ativos frente a esses microrganismos tem sido consideravelmente baixa (TROUDI *et al.*, 2021).

Dado essa crise emergente, é fundamental que sejam desenvolvidas estratégias que possam melhorar a eficácia dos medicamentos já utilizados na clínica, com o propósito de combater a resistência antimicrobiana (ESTRADA; WRIGHT; ANDERSON, 2016; TACCONELLI *et al.*, 2018). Assim, análises indicam que o direcionamento contra um único alvo torna a terapia menos bem-sucedida do que quando aplicada a combinação com outros agentes que possam ser direcionados a outros alvos (TYERS; WRIGHT, 2019; MIETHKE *et al.*, 2021).

Nesse sentido, a combinação entre agentes antibióticos busca atender a alguns objetivos, tais como: aumentar o espectro de ação antimicrobiano, obter efeitos sinérgicos, melhorando assim a eficácia, reduzir o surgimento da resistência e, principalmente, minimizar a toxicidade dos medicamentos (BAEDER *et al.*, 2016; ASLAM *et al.*, 2018).

Levando em consideração esses fatores, a utilização de produtos naturais tem se mostrado eficaz como alternativa passível de aplicação em terapias combinadas, de modo que possam atuar de forma sinérgica contra patógenos multirresistentes e/ou de alta prioridade, como o observado nos microrganismos relacionados com o desenvolvimento do CCR. Isso se baseia no fato de que os produtos naturais são fontes de diversas substâncias antimicrobianas, estimando-se que nos últimos 40 anos, cerca de 69% de todos os compostos antibacterianos são derivados dos mesmos (VENTOLA, 2015; MIETHKE *et al.*, 2021).

Os líquens são compostos por diferentes grupos de microrganismos, sendo estes formados pela coexistência simbiótica de uma alga e/ou cianobactéria e fungos. Contudo, relata-se que estes também podem ser compostos por leveduras e algumas comunidades bacterianas (SCHNEIDER; RESL; SPRIBILLE, 2016; LUZINA; SALAKHUTDINOV, 2018). Os mesmos produzem diversos metabólitos secundários, sendo o ácido úsnico (AU) um dos mais relatados na literatura em decorrência das suas atividades biológicas (PAGANO *et al.*, 2019).

O AU, [2,6-diacetil-7,9-dihidroxi-8,9b-dimetil-1,3(2H,9bH)-dibenzo-furandiona; C₁₈H₁₆O₇], é um derivado benzofurano oriundo de líquens pertencentes ao gênero *Usnea*, especialmente na espécie *U. longíssima*, bem como nos *Ramalina* e *Cladonia genera*, que exibe potencial de aplicação como um dos agentes na terapia combinada. Esse composto foi identificado em 1844 por Knop (Figura 9), contudo apenas em 1948

os estudos foram intensificados com o propósito de confirmar sua atividade antibacteriana (SHIBATA; UKITA, 1948). Sua aplicação na medicina popular é ampla, exibindo propriedades antituberculose, analgésica, antipirética, cicatrizante para feridas, antifúngica, além de antibióticas frente a patógenos que causam infecções de pele (GALANTY; PAŠKO; PODOLAK, 2019).

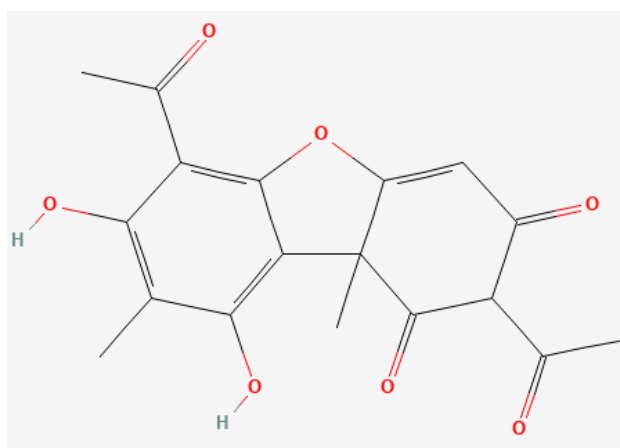


Figura 9. Estrutura química do ácido úsnico. Fonte: PUBCHEM, 2022.

O ácido úsnico é um pó pigmentado amarelado, que existe em duas formas enantioméricas, sendo estas dependentes da posição ao qual o grupo metila está no carbono quiral 9b, o (+)- ácido úsnico e (-)- ácido úsnico (Figura 10). O mesmo apresenta característica hidrofóbica, sendo, então, praticamente insolúvel em soluções aquosas, parcialmente solúvel em etanol, e solúvel em éter, acetona, metanol, clorofórmio, acetato de etila e diclorometano (CIMMINO *et al.*, 2019).

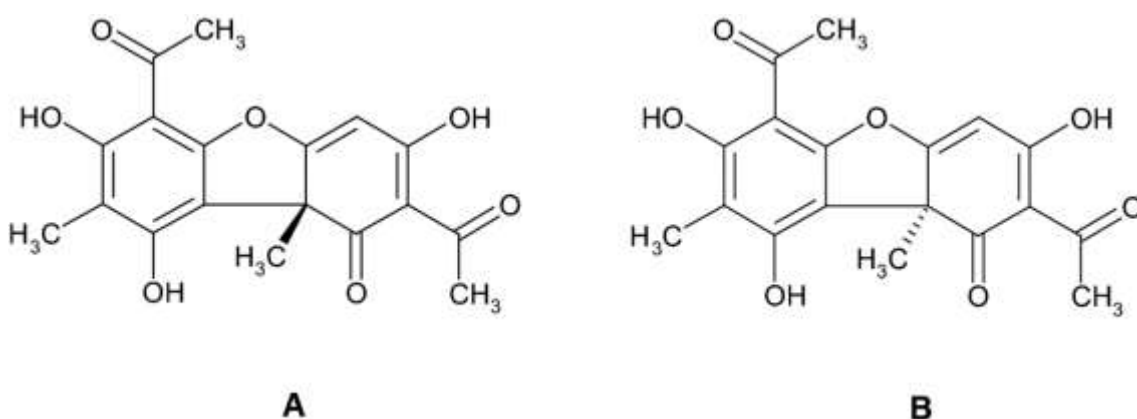


Figura 10. Enantiômeros do ácido úsnico (A) Destrógeno (+) e (B) Levónego (-).

Fonte: CIMMINO *et al.*, 2019.

O tempo de meia-vida é de 11,4 horas para a administração intravenosa e 18,9 horas para a via oral. Estima-se que a biodisponibilidade do AU, 32 µg/mL, é de 78% após administração oral (LUZINA; SALAKHUTDINOV, 2016). No ponto de vista do mecanismo de ação geral, embora este não esteja completamente elucidado, indica-se que o AU atua por meio de interações com a membrana celular, causando danos na sua integridade, além de destruir a função das mitocôndrias (ANTONENKO *et al.*, 2019).

Uma das principais atividades biológicas do AU relatadas na literatura é a antibiótica. Vários estudos indicam o potencial antibacteriano do AU frente a *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori* e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) (SHIBATA *et al.*, 1948; BEKKER *et al.*, 2015 SIENIAWSKA *et al.*, 2021; LAGE *et al.*, 2018; ZUO *et al.*, 2018; COSTA JÚNIOR *et al.*, 2020).

Contudo, apesar das propriedades, o AU apresenta hepatotoxicidade, através de mecanismos que induzem o aumento a produção de oxigênio reativo, levando à morte celular. Somado a isso, a baixa solubilidade em água, e, por consequência nos fluídos biológicos, impedem que este seja introduzido em sua forma livre na prática clínica (KWONG; WANG, 2020).

Uma vez que tanto a CAZ como o AU possuem algumas características, como toxicidade e baixa biodisponibilidade, que limitam suas administrações de forma eficaz, o uso de sistemas de liberação controlada para a encapsulação dessas moléculas é uma alternativa promissora (SI *et al.*, 2016; KWONG; WANG, 2020).

3.6 NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA

A nanotecnologia farmacêutica representa uma tecnologia promissora, podendo ser aplicada em uma diversidade de produtos, incluindo os alimentícios, cosméticos, e, principalmente, médicos. O surgimento da nanociência e da nanotecnologia tem exercido diversas influências nos rumos da ciência, especialmente no campo da indústria farmacêutica, mudando a forma de veiculação

de medicamentos, sendo, então, uma abordagem frequente nos campos da oncologia e microbiologia (KUMAR *et al.*, 2010; DMOUR; TAHA, 2018).

Os produtos obtidos através da nanotecnologia estão em nanoescala, ou seja, com tamanhos que variam de 1 a 1000 nm, possuindo, assim, propriedades físico-químicas e atividades biológicas diferenciadas, quando comparadas com os produtos em escalas maiores (KHAN *et al.* 2019). Portanto, uma das alternativas que vem sendo explorada no campo da nanociência é a utilização dos sistemas de liberação controlada (SLCs) (SAIKIA *et al.*, 2019).

Os primeiros relatos do desenvolvimento de SLCs são datados do início da década de 1960, como uma alternativa para veiculação de fármacos com velocidade de liberação constante e aumento da eficácia (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; WACKER, 2019). Assim, a sua aplicação tem por propósito liberar a substância encapsulada de forma constante, mantendo sua concentração dentro da faixa terapêutica, aumentando a biodisponibilidade, diminuindo os efeitos colaterais e a quantidade de administrações requeridas, e, por consequência, favorecendo a adesão do paciente à terapêutica (Figura 11) (GUPTA *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2019).

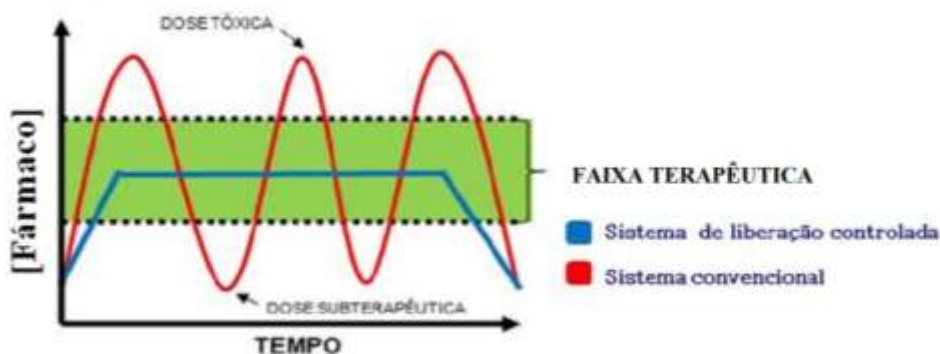


Figura 11. Farmacocinética de sistemas farmacêuticos convencionais em comparação com os sistemas de liberação controlada de fármacos. Fonte: CAMPOS, 2012.

As estratégias mais populares utilizadas na nanotecnologia incluem nanoemulsões, dendrímeros, micelas, nanocápsulas, nanopartículas lipídicas sólidas, e os lipossomas, a fim de direcionar as drogas encapsuladas através das barreiras

fisiológicas, incluindo a hematoencefálica e a gastrointestinal (JAMPILEK; KOS; KRALOVA, 2019; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2020). Assim, a Tabela 1 apresenta os principais SLCs e suas aplicações no âmbito da medicina.

Tabela 1. Sistemas de liberação controlada e suas principais aplicações biológicas.

Sistema	Definição	Algumas aplicações biológicas	Referência
Nanoemulsões	Sistemas coloidais, compostos por dois líquidos imiscíveis, solubilizados com a utilização de agentes emulsificantes (surfactantes e co-surfactantes) a fim de formar uma única fase	Imunoterapia no câncer, antibacteriana, antioxidante, antifúngica e anti-inflamatória	GURPREET; SINGH, 2018; ÖZOGUL; ABED; ÖZOGUL, 2022.
Dendrímeros	Nanoestruturas poliméricas com formato globular tridimensional com ramificações	Anticâncer, antiviral, antimicrobiana e antioxidante	PEDZIWIATR-WERBICKA <i>et al.</i> , 2019; KOKAZ <i>et al.</i> , 2022.
Micelas	Partículas coloidais, com uma extremidade hidrofílica, nomeada de “cabeça”, e uma longa cauda hidrofóbica	Antitumoral, hipoglicemiante e antioxidante	KESHARWANI <i>et al.</i> , 2019; LI <i>et al.</i> , 2021.

Nanocápsulas	Possui uma estrutura sólida esférica polimérica que recobre externamente um núcleo líquido/sólido	Antitumoral, antibacteriana, antifúngica e antiparasitária.	DENG <i>et al.</i> , 2020; SHAKER <i>et al.</i> , 2022.
Nanoesferas	Não apresentam óleo na sua composição, sendo, então, formadas por uma matriz polimérica	Antimicrobiana e antioxidante	DICASTILLO <i>et al.</i> , 2019; FUNDA <i>et al.</i> , 2020.
Nanopartículas lipídicas sólidas	Sistemas nanoestruturados cuja fase interna apresenta lipídeos no estado sólido	Antitumoral, cicatrizante, antimicrobiana e antiparasitária	DUDHIPALA, 2020; GEBRIL <i>et al.</i> , 2022.
Lipossomas	Nanossistemas compostos por uma ou mais bicamadas de fosfolipídeos, que circundam um núcleo aquoso	Tratamento do Alzheimer, antitumoral, cicatrizante, antimicrobiana e antiparasitária	WILLIAM <i>et al.</i> , 2020; HERNANDEZ; SHUKLA, 2022.

Um SLC ideal deve possuir: I) Capacidade de direcionar seletivamente os fármacos para o local de ação; II) Não expor o fármaco a tecidos não desejados; III) Ser farmacologicamente inativo, baixa toxicidade, e que seja metabolizado e eliminado após o cumprimento da sua função; e IV) Possuir fácil transporte e administração no paciente (PATIL *et al.*, 2019; NAQVI; PANGHAL; FLORA, 2020). Assim diversas alternativas têm sido desenvolvidas para apresentar todas essas características, sendo os lipossomas um dos nanocarreadores mais descritos com esse propósito (HERNANDEZ; SHUKLA, 2022).

3.7 LIPOSSOMAS

Os lipossomas foram descobertos em meados de 1963, após observações anteriores do comportamento de fosfolipídios em soluções aquosas por Alec Bangham. Em 1970, Gregory Gregoriadis passou a investigar a capacidade desses nanocarreadores de encapsular fármacos e a liberação controlada do encapsulado (GREGORIADIS, 2018; GOMEZ; HOSSEINIDOUST, 2020). Assim, desde estes achados, esses sistemas passaram a ser amplamente investigados como alternativa para o tratamento de diversas patologias, incluindo as causadas por microrganismos (THAHER; PERNI; PROKOPOVICH, 2019).

Lipossomas são definidos por sistemas compostos por uma ou mais bicamadas constituídas de fosfolipídios, que circundam um núcleo aquoso. Nesse sentido, em virtude da sua natureza físico-química anfifílica, os mesmos podem promover a veiculação de substâncias hidrofóbicas na sua bicamada lipídica, ou hidrofílicas no seu compartimento aquoso (VAHED *et al.*, 2017; WILLIAM *et al.*, 2020). Ademais, os lipossomas são biocompatíveis, biodegradáveis e não imunogênicos, permitindo assim, a sua aplicação na saúde (MOKDAD *et al.*, 2022).

Os fosfolipídios são os principais componentes dos lipossomas, dentre eles a lecitina de soja, de ovo, marinha e fosfolipídio do leite, além da dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), diestearoilfosfatidilcolina (DSPC) ou dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC). O colesterol é normalmente adicionado nas formulações com a finalidade de promover a estabilização da membrana (AHMED *et al.*, 2019; LIMA *et al.*, 2021).

Dessa forma, os lipossomas possuem característica anfipáticas, com uma cabeça hidrofílica e uma cadeia hidrofóbica composta por ácidos graxos, assim, quando adicionado em água, a porção hidrofóbica se arranja de modo que seja formada uma bicamada. A partir disso, é formada uma estrutura circular com o interior aquoso recoberta por uma bicamada fosfolipídica (Figura 12) (AJEESHKUMAR *et al.*, 2021).

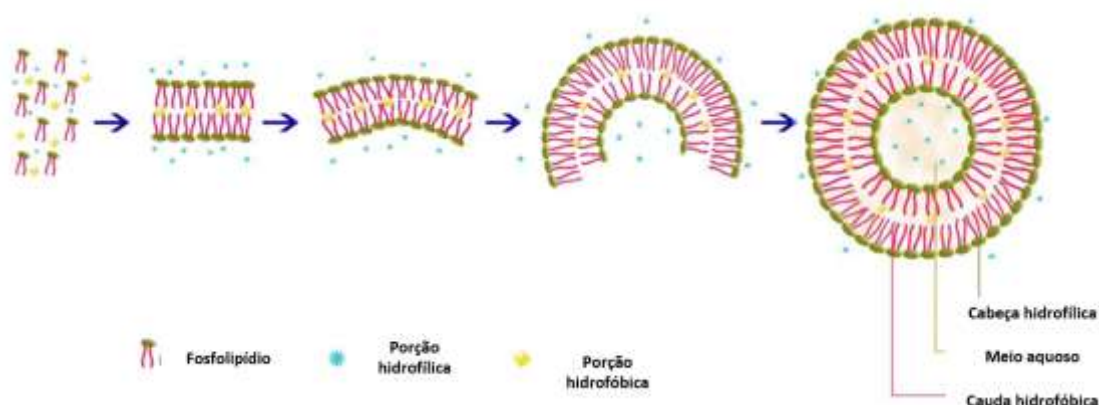


Figura 12. Processo de formação do lipossoma. Fonte: Adaptado de AJEESHKUMAR *et al.*, 2021.

De forma geral, os lipossomas são classificados de acordo com o seu tamanho e quantidade de camadas, podendo se diferir como vesículas muito pequenas ($0,025\ \mu\text{m}$) a grandes ($5,0\ \mu\text{m}$), sendo esta uma característica fundamental para determinar o tempo de meia-vida, assim como a quantidade de substância encapsulada no mesmo. É possível classificá-los em duas grandes categorias, os multilamelares (VML) e os unilamelares (VUL), sendo estes novamente subdivididos em: I) VUL gigante – com $1\ \mu\text{m}$ de diâmetro; II) VUL pequenas – com tamanho variando de $20\text{-}200\ \text{nm}$; e III) VML multivesiculares - com menos de $1\ \mu\text{m}$ de tamanho (SUBRAMANI; GANAPATHYSWAMY, 2020; YANG, 2021).

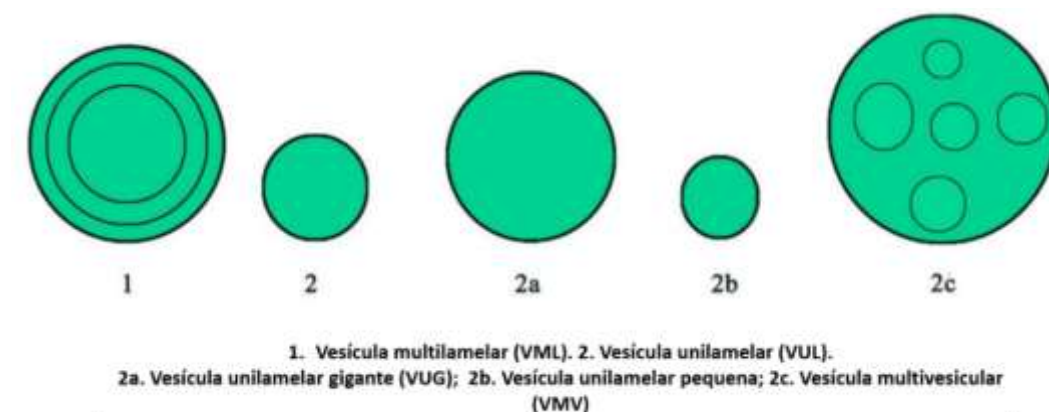


Figura 13. Classificação do lipossoma com base no tamanho e lamelaridade. Adaptado de AJEESHKUMAR *et al.*, 2021.

Quanto à composição química, os lipossomas podem ser classificados como convencionais, furtivos, sítio-específicos, pH-sensíveis e termosensíveis (Figura 14) (KÓSA *et al.*, 2021). Os lipossomas convencionais são constituídos basicamente por fosfolipídios, de carga positiva ou negativa, e colesterol. Contudo uma grande problemática envolvida na sua aplicação clínica é o reconhecimento realizado pelo sistema fagocitário, ocasionando em rápida remoção da circulação sanguínea, devido a opsonização e depuração com facilidade (AZZI *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2021).

Com base na necessidade de reverter os problemas encontrados nas formulações convencionais, foram desenvolvidos lipossomas furtivos, ou de longa circulação, sendo estes obtidos através de revestimento com polímero da superfície da bicamada (NASCIMENTO *et al.*, 2020). Os polímeros mais utilizados são o polietilenoglicol, monossialogangliosídeo e fosfatidilinositol, que possibilitam redução da adsorção de proteínas, aumentam o tempo de circulação e são menos antigênicos (PERLI *et al.*, 2019; SARASWAT; MAHER, 2020).

Apesar de terem superado os problemas dos sistemas convencionais, os lipossomas furtivos não apresentam alta especificidade para células alvo. Assim, foi necessário o desenvolvimento de um novo tipo de formulação, os lipossomas sítio-específicos a partir da adsorção de anticorpos, proteínas, peptídeos, aptâmeros na superfície desses nanocarreadores. A partir dessa funcionalização, são modificadas as formas de entrega para a célula alvo, estimulando os mecanismos de endocitose e melhoras na resposta após ligação com os receptores celulares (LEE; THOMPSON, 2017; JANI; GOHIL, 2018).

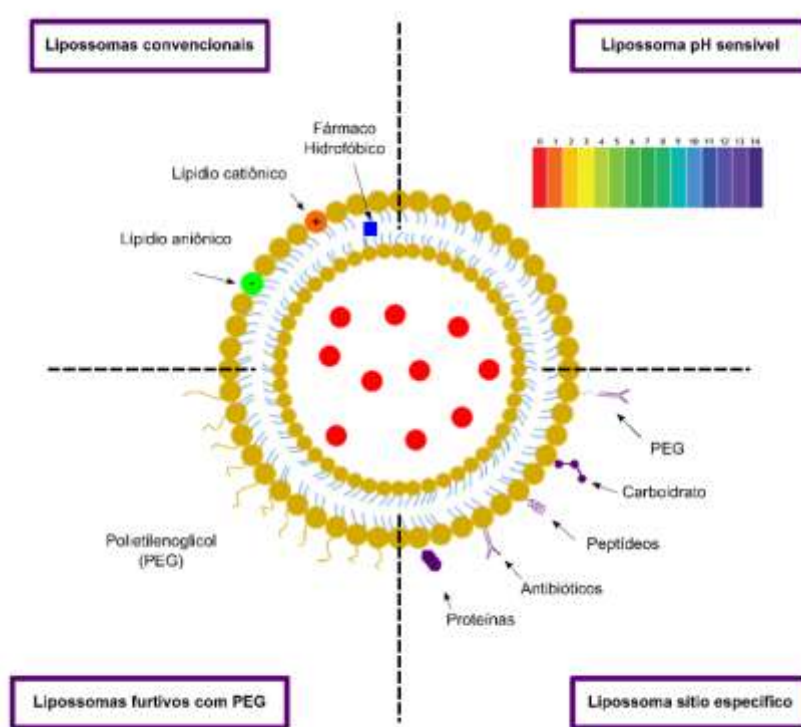


Figura 14. Características estruturais de lipossomas convencionais, furtivos, sítio-específicos e pH sensíveis. Fonte: SILVA *et al.*, 2021.

Além dos lipossomas citados anteriores, outros tipos têm sido investigados, sendo eles o pH-sensíveis, que se desintegram em meios ácidos ou básicos, e termossensíveis que, são sensíveis a estímulos de temperatura. A composição básica desses lipossomas é de polietileno glicol-fosfatidiletanolamina (PEG-PE) à base de hidrazona derivada de aldeído (HZ) (PEG-PE-HZ) para os pH-sensíveis, e DPPC, DSPC, PEG, fosfatidilcolina e colesterol para os termossensíveis (AGHDAM *et al.*, 2019).

3.7.1 Lipossomas revestidos com quitosana

Os lipossomas representam um dos SLCs pioneiros para a encapsulação e entrega de medicamentos, porém a maioria deles são facilmente degradados em pH gástrico, ou, ainda, por ação de enzimas presentes nos sais biliares, além disso, são suscetíveis a agregação e fusão de vesículas – fatores que podem induzir ao

vazamento da substância encapsulada. Portanto, várias pesquisas foram realizadas para propor estratégias que ultrapassem essas limitações e a utilização de polímeros como revestimentos é considerada promissora, uma vez que permite, além de reduzir os fatores que os tornam instáveis, favorece a sua administração oral (HAO *et al.*, 2017; ZHOU *et al.*, 2018; DONG *et al.*, 2022).

Relata-se que, além de garantir estabilidade da formulação, o revestimento melhora significativamente a absorção através dos enterócitos, aumentando a disponibilidade do fármaco encapsulado. Alguns produtos são investigados quanto a sua capacidade de revestimento, tais como o eudragit S100, um revestimento entérico, contudo, estes não resistem à ação dos sais biliares. A pectina, um agente gelificante, e o polietilenoglicol (PEG), também são propostos, pois existem relatos que lipossomas revestidos com os mesmos se apresentaram estáveis frente ao ambiente estomacal e os sais biliares. Contudo, a quitosana segue como uma molécula de revestimentos com os melhores resultados de estabilidade e melhorias na biodisponibilidade do fármaco encapsulado (LIU *et al.*, 2018; HE *et al.*, 2019).

Logo, a quitosana surge como uma possível molécula de revestimento com capacidade de aplicação para lipossomas. Logo, trata-se de um polissacarídeo de origem natural, obtido através da desacetilação parcial da quitina, encontrado no exoesqueleto de crustáceos, composto por unidades de N-acetil-D-glucosamina unidos entre si por ligações do tipo $\beta(1,4)$ -glicosídicas. Uma vez que na sua estrutura se fazem presentes grupos amino, a mesma apresenta carga positiva e solubilidade em soluções ácidas (Figura 15) (ALAVI; HAERI; DADASHZADEH, 2017; COLINO *et al.*, 2022).

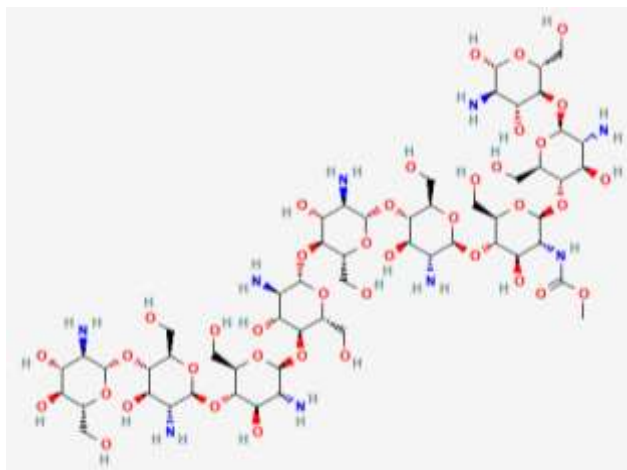


Figura 15. Estrutura química da quitosana. Fonte: PUBCHEM, 2022.

A aplicação biológica da quitosana tem sido amplamente explorada nos campos das ciências da saúde, uma vez que demonstra potencial de utilização na engenharia de tecidos, indústria alimentícia e, mais recentemente, na indústria farmacêutica em sistemas de veiculação de medicamentos para administração oral, ocular e nasal (SENEL; YUKSEL, 2020).

Logo, SLCs revestidos com quitosana são estudados em virtude das atividades protetoras do fármaco contra a degradação enzimática no trato gastrointestinal, aumento na biodisponibilidade do encapsulado, além da bioadesão – fator que auxilia tanto para entrega de medicamentos administrados via oral no intestino, assim como na penetração nas membranas celulares. Ademais, a quitosana é biodegradável, biocompatível, possui atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, cicatrizante e imunomoduladora (ALAVI; HAERI; DADASHZADEH, 2017; HAMED *et al.*, 2022).

Dado o seu comportamento polcatiônico, as moléculas de quitosana podem revestir a superfície lipossomal por meio de interações eletrostáticas dos seus grupos aminos protonados com o grupo fosfato de carga negativa presente na cabeça hidrofílica dos lipossomas (Figura 16). Estes lipossomas revestidos possuem formato esférico, como um lipossoma convencional, contudo o tamanho tende a aumentar, além de modificação no potencial zeta de neutro para positivo, diminuindo, assim, a instabilidade do sistema (GIBIS; RUEDT; WEISS, 2016; ESPOSTO *et al.*, 2021).

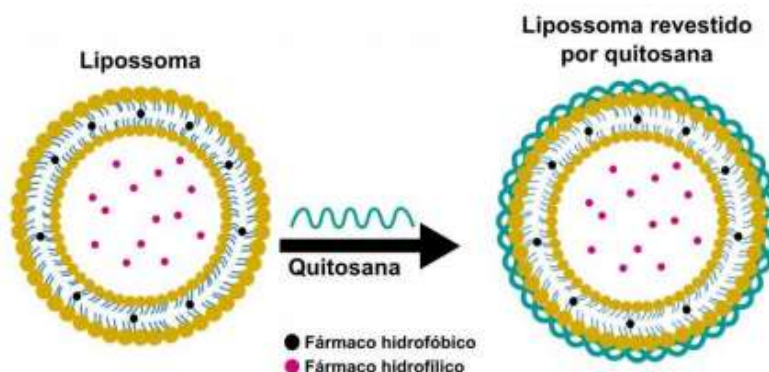


Figura 16. Representação de um lipossoma revestido com quitosana. Fonte: SOUZA *et al.*, 2020.

Substâncias encapsuladas em lipossomas revestidos com quitosana no intestino interagem com a membrana celular, que possui carga negativa, e induzem abertura nas junções celulares do epitélio intestinal, para, posteriormente, serem transportadas através do tecido. Assim, é viável a veiculação de medicamentos que tenham por propósito atuarem diretamente no intestino, como os antibióticos para fins de erradicação de bactérias relacionadas ao surgimento do CCR (ALSHAMSAN *et al.*, 2019; FU *et al.*, 2019; FONG *et al.*, 2020).

Já é comprovada a eficácia desse sistema no tratamento de infecções bacterianas, conforme observado por Mehanna, Elmaradny e Samaha (2010) com uma formulação para via ocular contendo ciprofloxacino frente a *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Fu *et al.* (2019) também demonstraram esse potencial de lipossomas revestidos com quitosana encapsulando polimixina B frente a biofilmes de *Acinetobacter baumannii*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Fármacos e Reagentes

Ceftazidima pentahidratada (CAZ), Ácido úsnico (AU), quitosana de baixo peso molecular (QUI), colesterol foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Co. Ltd. (St. Louis, MO, EUA). Tween 80 foi adquirido da Neon Comercial (Suzano, SP, Brasil), ácido acético glacial da Química Moderna (Barueri, SP, Brasil). O metanol e clorofórmio (grau HPLC) foram adquiridos da Merck Millipore (Darmstadt, Germany). Fosfolípidos, Lipoid S100 foi adquirido de Lipoid KG, Alemanha. Todos os outros produtos químicos utilizados foram de grau analítico.

4.1.2 Bactérias

Escherichia coli ATCC 25922 e *E. coli* H10407 foram adquiridas da American Type Culture Collection e *E. coli* NCTC 13846 foi adquirida da Thermo Fisher Scientific.

4.2 PREPARAÇÃO DOS LIPOSSOMAS COM O REVESTIMENTO DE QUITOSANA CONTENDO CAZ, AU e CAZ+AU

Os lipossomas com quitosana (Lipo-Qui) foram preparados pelo método de hidratação do filme lipídico seguido de sonicação. Os lípidos, colesterol (CH), e fosfatidilcolina (PC), Tween 80 (7:2:1) foram solubilizados em solvente orgânico sob agitação magnética. Em seguida, se formou o filme lipídico pela evaporação dos solventes à pressão reduzida. O filme lipídico formado foi ressuspenso em tampão fosfato pH 7,4 formando espontaneamente lipossomas multilamelares grandes (MLV) que foram posteriormente sonificados para obtenção de lipossomas unilamelares pequenos (SUV) (CAVALCANTI *et al.*, 2011). Para o revestimento com quitosana dos lipossomas a quitosana foi solubilizada em ácido acético glacial. A solução de quitosana foi submetida à agitação constante *overnight*. Os lipossomas foram

adicionados gota a gota na solução de quitosana e se mantiveram sob agitação magnética por 1h (ALSHAMSAN *et al.*, 2019).

Similarmente, o lipossoma revestido com quitosana contendo a CAZ (Lipo-CAZ-Qui) foi preparado seguindo as mesmas etapas da preparação de Lipo-Qui, contudo na etapa de hidratação do filme formado, o lipossoma foi ressuspenso com a solução de CAZ (2 mg/mL) solubilizada em tampão fosfato pH 7,4. Já para o lipossoma revestido com quitosana contendo AU (Lipo-AU-Qui), a adição de AU foi feita na etapa de solubilização com solvente orgânico, na concentração de 2 mg/mL. Finalmente, as formulações coencapsulando CAZ e AU (Lipo-CAZ-AU-Qui) foram feitas unindo as etapas citadas anteriormente, com a solubilização do AU (1 mg/mL) no solvente orgânico e hidratação do filme formado com a solução de CAZ (1 mg/mL).

4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS

4.3.1 Tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e pH dos lipossomas

Lipo-Qui, Lipo-CAZ-Qui, Lipo-AU-Qui e Lipo-CAZ-AU-Qui foram submetidos à caracterização físico-química através da análise do tamanho de partícula ($\emptyset$), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (ζ) e pH como previamente descrito por Cavalcanti *et al.* (2011). As dispersões de lipossomas foram mensuradas por espectroscopia de correlação de fótons utilizando o Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern, Worcestershire, Reino Unido). Para análise do $\emptyset$ e PDI, 50 μ L da dispersão lipossomal foram diluídos em 950 μ L de água purificada. As medições foram realizadas a 25 °C com um ângulo fixo de 90° e os resultados foram expressos como a média do diâmetro hidrodinâmico dos lipossomas (nm). O ζ dos lipossomas também foi medido após a diluição de 50 μ L da dispersão de lipossomas em 950 μ L de uma solução de água ultrapura. A carga superficial dos lipossomas (mV) foi avaliada utilizando o Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern, Worcestershire, Reino Unido). O pH do lipossoma foi medido com um eletrodo de vidro e um medidor de pH digital MS Tecnocon (mPA-210P, São Paulo, Brasil) em temperatura ambiente.

4.3.2 Determinação do teor e eficiência de encapsulação da ceftazidima em lipossomas

Para determinar o teor de CAZ nas formulações, 25 µL de Lipo-CAZ-Qui foi diluído em CH₃OH 70%, centrifugada durante 10 minutos e o sobrenadante foi mensurado por espectrofotometria no comprimento de onda de 255 nm. Os resultados foram expressos em percentual a partir da média as absorbâncias. O experimento foi realizado em triplicata em três experimentos independentes.

A eficiência de encapsulação (%EE) de CAZ nos lipossomas foi determinada pela técnica de ultrafiltração/ultracentrifugação, utilizando unidades de filtração (Amicon Ultra Centrifugal Filters; Millipore, Billerica, MA). Amostras de lipossomas (400 µL) foram inseridas nos filtros e submetidas à ultracentrifugação a 8.000 rpm a 4 °C por 1h. Para determinação da %EE de CAZ, uma alíquota da amostra filtrada (25 µL) foi diluída em CH₃OH 70%, e mensurado por espectrofotometria, onde os resultados foram expressos em percentual a partir da média as absorbâncias. Os dados de %EE de CAZ foram calculados usando a equação descrita abaixo:

$$\% EE = \text{Total de CAZ} - \text{filtrado de CAZ} \times 100 / \text{Total de CAZ}$$

4.3.3 Determinação do teor e eficiência de encapsulação de ácido úsnico em lipossomas

Para determinar o teor de AU nas formulações, 20 µL de Lipo-AU-Qui foi diluído em CH₃OH 100%, centrifugada durante 10 minutos e o sobrenadante foi mensurado por espectrofotometria no comprimento de onda de 280 nm. Os resultados foram expressos em percentual a partir da média as absorbâncias. O experimento foi realizado em triplicata em três experimentos independentes.

A eficiência de encapsulação (%EE) de AU nos lipossomas também foi determinada pela técnica de ultrafiltração/ultracentrifugação como descrito acima.

4.3.4 Espectroscopia no infravermelho por transformada de fourier e difração de raios-x dos lipossomas

Para análise por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier, os espectros de FT-IR dos Lipo-CAZ-QUI, Lipo-AU-Qui, Lipo-CAZ-AU-QUI, Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-QUI, Lipo-Qui, Lipo-SQui, Lipo-AU, Lipo-CAZ, AU foram obtidas a partir da mistura das amostras liofilizadas em pó de brometo de potássio (KBr) e medida espectrofotômetro de transformação de Fourier (Frontier). As amostras foram escaneadas de 4000 a 400 cm^{-1} , obtendo-se os espectros com resolução de 4 cm^{-1} (CHEN *et al.*, 2020).

A análise de difração de raios-X Lipo-CAZ-QUI, Lipo-AU-Qui, Lipo-CAZ-AU-QUI, Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-QUI, Lipo-Qui, Lipo-SQui, Lipo-AU, Lipo-CAZ, AU foi realizada usando difração de raios-X (Difratômetro de raios X, Rigaku, modelo Miniflex). Os dados foram coletados em uma faixa angular de 5° a 50° 2-teta em modo contínuo usando um tamanho de etapa de $0,02^\circ$ 2-teta e tempo de etapa de 5 s (LIANG *et al.*, 2017).

4.3.5 Análises térmicas por termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial dos lipossomas

As curvas de TGA de Lipo-CAZ-QUI, Lipo-AU-Qui, Lipo-CAZ-AU-QUI, Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-QUI, Lipo-Qui, Lipo-NQui, Lipo-AU, Lipo-CAZ, AU foram obtidas através do equipamento de TGA (TGA Q500; TA Instruments, EUA). As amostras (5mg) foram aquecidos em uma bandeja de platina a uma taxa de $10^\circ\text{C} / \text{min}$, com fluxo de ar sintético de 20 mL/min da temperatura 0 até 600°C (ROSA *et al.*, 2015).

As curvas de DSC de Lipo-CAZ-QUI, Lipo-AU-Qui, Lipo-CAZ-AU-QUI, Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-QUI, Lipo-Qui, Lipo-NQui, Lipo-AU, Lipo-CAZ, AU foram obtidas usando um DSC (DSC Q10; TA Instruments, EUA). Cada amostra analítica (5 mg, base seca) foi pesada com precisão em uma bandeja de alumínio e, em seguida, a bandeja foi selada. As amostras foram aquecidas da temperatura de 0 a 300°C a uma

taxa de aquecimento constante de 10°C/min e vazão 20 mL/min de ar sintético (PARK, PARK, KIM, 2015).

4.4 ESTABILIDADE DOS LIPOSSOMAS

4.4.1 Estabilidade dos lipossomas em condições de pH gastrointestinais simuladas

A estabilidade dos lipossomas foi avaliada em soluções de meios biológicos pH gástrico e intestinal simulados, as quais foram preparadas de acordo com Cavalcanti *et al.* (2021). Inicialmente, foram adicionados 250 µL de Lipo-CAZ-QUI, Lipo-AU-Qui, Lipo-CAZ-AU-QUI, Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-QUI ou Lipo-Qui, em 750 µL de solução gástrica (pH 1,2) ou intestinal (pH 6,8) em microtubos. Os microtubos foram mantidos em agitação (70 rpm) a 37 °C por 2 h. Em intervalos de 30 minutos até atingir 120 min, as alíquotas foram retiradas e avaliadas quanto ao Ø, PDI e ζ.

4.4.2 Estabilidade das dispersões lipossomais

A estabilidade físico-química das dispersões lipossomais de Lipo-Qui, Lipo-CAZ-QUI, Lipo-AU-Qui, Lipo-CAZ-AU-QUI, Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-QUI foram avaliadas 24h após a formulação, após armazenamento em geladeira a 2°C. As formulações foram monitoradas após 7, 15, 30, 60 e 120 dias após formuladas através da avaliação dos seguintes parâmetros: aspecto macroscópico, Ø, PDI, ζ, pH, teor e taxa de encapsulação para os lipossomas contendo fármaco.

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A atividade antibacteriana *in vitro* de CAZ, AU, Lipo-Qui, Lipo-CAZ-Qui, Lipo-AU-Qui, Lipo-CAZ-AU-Qui e Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-Qui foi avaliada pelo método de

microdiluição em caldo de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2019).

Inicialmente foi distribuído caldo Müeller-Hinton em cada poço das placas. Em seguida, foram adicionados, CAZ, AU, Lipo-Qui, Lipo-CAZ-Qui, Lipo-AU-Qui, Lipo-CAZ-AU-Qui e Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-Qui, através de diluição seriada e por fim as suspensões de *Escherichia coli* ATCC 25922, *E. coli* NCTC13846 e *E. coli* H10407. As microplacas foram incubadas a 35 °C por 24h e a concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada por espectrofotometria no comprimento de onda de 630 nm.

A concentração bactericida mínima (CBM) foi determinada depois dos resultados de CIM. Uma alíquota dos microrganismos dos poços em que não há crescimento visível foi inoculada em ágar Müeller-Hinton e as placas foram incubadas a 35 °C por 24h. Após este período a CBM foi determinada como a menor concentração que não há crescimento microbiano (CLSI, 2019). Todo o experimento foi realizado em triplicatas independentes.

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME

4.6.1 Determinação da concentração de inibição da formação do biofilme

A determinação da concentração de inibição da formação do biofilme de CAZ, AU, Lipo-Qui, Lipo-CAZ-Qui, Lipo-AU-Qui, Lipo-CAZ-AU-Qui e Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-Qui frente a *E. coli* H10407, cepa produtora de biofilme, foi realizada através do método do cristal violeta. Inicialmente foi distribuído caldo triptona de soja (TSB) + glicose em cada poço das placas de microdiluição. Em seguida foram adicionados CAZ, AU, Lipo-Qui, Lipo-CAZ-Qui, Lipo-AU-Qui, Lipo-CAZ-AU-Qui e Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-Qui através de diluição seriada e posteriormente foram adicionadas as suspensões bacterianas. As microplacas foram incubadas a 35 °C por 24 h. Após incubação o conteúdo dos poços foi aspirado e foram realizadas lavagens com salina 0,9%. As placas foram secas e em seguida as bactérias aderidas foram fixadas com metanol a 99%. Após a fixação o metanol foi removido e as placas foram postas para secar novamente.

Posteriormente, as bactérias aderidas nas placas foram coradas com cristal violeta a 1%. O excesso de corante foi removido e realizou-se lavagens com salina em cada poço. Em seguida a análise do resultado foi realizada através de espectrofotometria a 570 nm (Multiskan FC microplate photometer, Thermo Scientific, Madrid, Espanha). A concentração de inibição da formação do biofilme foi determinada em % (PEETERS *et al.*, 2016). Todo o experimento foi realizado em triplicatas independentes.

4.6.2 Determinação da concentração de inibição do biofilme pré-formado

A determinação da concentração de inibição do biofilme pré-formado de CAZ, AU, Lipo-Qui, Lipo-CAZ-Qui, Lipo-AU-Qui, Lipo-CAZ-AU-Qui e Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-Qui frente a *E. coli* H10407 foi realizada através do método do cristal violeta. Inicialmente as cepas foram ajustadas na escala 0,5 de McFarland. A contagem de células foi confirmada por espectrofotometria a 630 nm e as suspensões bacterianas foram distribuídas em placas de microdiluição de fundo plano até uma concentração final de 10^5 UFC/mL e incubadas a 35 °C por 24 h. Após o crescimento do biofilme, o conteúdo de cada poço foi aspirado e diluições em série dos compostos foram realizadas em caldo triptona de soja (TSB) e adicionadas a cada poço.

As placas foram novamente incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h. Após incubação, o conteúdo dos poços foi aspirado e foram realizadas lavagens com salina 0,9%. As placas foram secas e em seguida as bactérias aderidas foram fixadas com metanol a 99%. Após a fixação o metanol foi removido, as placas foram postas para secar novamente. Posteriormente, as bactérias aderidas nas placas foram coradas com cristal violeta a 1%. O excesso de corante foi removido e foram realizadas lavagens com salina em cada poço. Em seguida a análise do resultado foi realizada através de espectrofotometria a 570 nm (Multiskan FC microplate photometer, Thermo Scientific, Madrid, Espanha). A concentração inibitória mínima do biofilme pré-formado foi determinada em % (PEETERS *et al.*, 2016). Todo o experimento foi realizado em triplicatas independentes.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS

5.1.1 Tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e pH dos lipossomas

Lipo-Qui apresentaram $\emptyset$ de $97,72 \pm 0,7$ nm, PDI de 0,298, ζ de $+12,4 \pm 0,9$ mV e pH de 5, por sua vez, Lipo-CAZ-Qui apresentaram $116,5 \pm 5,3$ nm, 0,401, $+16,4 \pm 0,6$ mV e 5,2, Lipo-AU-Qui possui $136,6 \pm 5,1$ nm, 0,465, $+28 \pm 0,8$ mV e 5, enquanto Lipo-CAZ-QUI apresentou $240,3 \pm 3,5$ nm, 0,411, $+24,9 \pm 0,1$ mV e 5, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 2. Caracterização quanto ao tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, pH, teor e eficiência de encapsulação de Lipo-CAZ-Qui, Lipo-AU-Qui, Lipo-CAZ-AU-Qui e Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-Qui.

Formulação	$\emptyset$ (nm)	PDI	ζ (mV)	pH	Teor (%)	%EE
Lipo-CAZ-Qui	$116,5 \pm 5,3$	0,401	$+16,4 \pm 0,6$	5,2	$98,5 \pm 0,4$	$51,5 \pm 0,2$
Lipo-AU-Qui	$136,6 \pm 5,1$	0,465	$+28 \pm 0,8$	5,0	$98,9 \pm 0,3$	$99,9 \pm 0,1$
Lipo-CAZ-AU-Qui	$240,3 \pm 3,5$	0,411	$+24,9 \pm 0,1$	5,0	$98,3 \pm 0,1$ (CAZ)	$45,2 \pm 0,5$ (CAZ)
					$98,7 \pm 0,6$ (AU)	$95,6 \pm 0,3$ (AU)
Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-Qui	$212,8 \pm 0,7$	0,563	$+22,9 \pm 1,2$	5,2	$98,2 \pm 0,2$ (CAZ)	$50,7 \pm 3$ (CAZ)
					$98,5 \pm 0,4\%$ (AU)	$98,9 \pm 0,5$ (AU)

Ø: Tamanho de partícula; PDI: Índice de polidispersão; ζ : Potencial zeta; %EE: Eficiência de encapsulação; Lipo-CAZ-Qui: Lipossomas revestidos com quitosana encapsulando CAZ; Lipo-AU-Qui: Lipossomas revestidos com quitosana encapsulando AU; Lipo-CAZ-AU-Qui: Lipossomas revestidos com quitosana coencapsulando CAZ e AU; Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-Qui: Amostra *Pool*.

Conforme demonstrado na Figura 17, o aspecto macroscópico das formulações de Lipo-Qui (Figura 17A), Lipo-CAZ-Qui (Figura 17B) foi uniforme, sem floculação, com coloração branco leitosa e com opalescência azul clara. Os Lipo-AU-Qui (Figura 17C) e Lipo-CAZ-AU-Qui (Figura 17D) apresentaram-se com as mesmas características citadas anteriormente, contudo a coloração da formulação foi amarelada, em decorrência da presença do ácido úsnico. Assim, todas as formulações apresentaram características compatíveis com partículas de escala nanométrica (ALSHAMSAN *et al.*, 2019; RAN *et al.*, 2020).

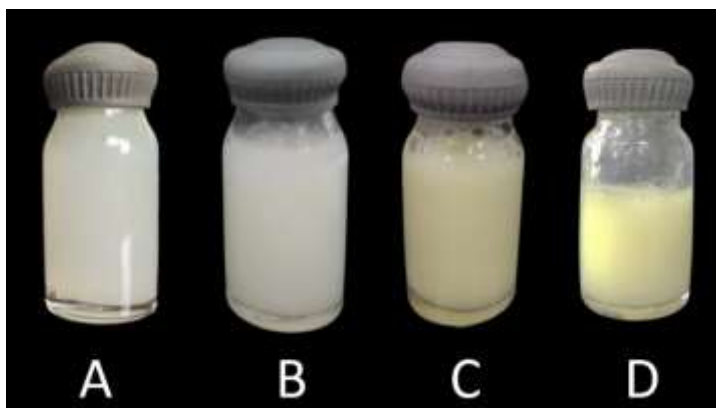


Figura 17. Aspecto macroscópico de lipossomas com revestimento de quitosana (Lipo-Qui) (A), lipossomas revestidos com quitosana encapsulando CAZ (Lipo-CAZ-Qui) (B), lipossomas revestidos com quitosana encapsulando AU (Lipo-AU-Qui) (C) e lipossomas revestidos com quitosana coencapsulando CAZ e AU (Lipo-CAZ-AU-Qui) (D).

Os Ø de Lipo-CAZ-Qui, Lipo-AU-Qui, Lipo-CAZ-AU-Qui e Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-Qui ($116,5 \pm 5,3$ nm, $136,6 \pm 5,1$ nm, $240,3 \pm 3,5$ nm, $212,8 \pm 0,7$ nm, respectivamente), se mostraram maiores que Lipo-Qui ($97,72 \pm 0,7$ nm), sugerindo

que houve um rearranjo da formulação para a incorporação do fármaco no sistema, consequentemente, elevando os valores de ζ . Além disso, notou-se que não houveram alterações significativas de valores de ζ para Lipo-Qui e Lipo-CAZ-Qui indicando que o fármaco está encapsulado no lipossoma, contudo, em Lipo-AU-Qui e Lipo-CAZ-AU notou-se um aumento nesse parâmetro, sendo este atribuído à inserção do AU na bicamada de fosfolípídeo e sua aproximação na cabeça polar dos fosfolípídeos, que, ao se organizar dessa forma, o ζ é aumentado (ZHAO *et al.*, 2018; BATTISTA *et al.*, 2020; RAN *et al.*, 2020).

O tamanho de partícula é um dos fatores fundamentais que viabiliza a administração de formulações lipossomais por via oral, uma vez que já é consolidado que nanocarreadores com tamanhos inferiores à 70 nm são facilmente removidos por mecanismos fisiológicos, pelo muco produzido no intestino, bem como por absorção sistêmica. Logo, estudos demonstram que tamanhos entre 70 e 400 nm são ideais para possibilitar a eficácia da utilização do lipossoma por essa via (NGUYEN *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2018; YU *et al.*, 2018; ZHAO *et al.*, 2018). Assim, os tamanhos de partícula dos lipossomas aqui descritos são compatíveis para uma possível administração oral.

Em geral, a via de administração oral possui maior aceitação por parte dos pacientes, apresentando diversas vantagens quando comparadas com a via parenteral, tais como: I) Redução da dor para administração; II) Inexistência da colonização de acessos venosos por microrganismos patogênicos, como bactérias e fungos; III) Redução dos custos dos sistemas e prestadoras de saúde quanto à internação, atendimento ambulatorial e suporte por parte da equipe de saúde; IV) Maior facilidade para armazenamento e transporte; e V) Menor abandono do tratamento (KHURANA *et al.*, 2016; QU *et al.*, 2017; SONI; RIZWANULLAH; KOHLI, 2018).

O índice de polidispersão é responsável por medir a homogeneidade de tamanho de partículas dispersas e varia de 0 a 1, onde valores próximos a 0,1 representam partículas altamente monodispersas, contudo, valores até 0,6 são considerados aceitáveis para aplicações farmacêuticas (VAHEDIKIA *et al.*, 2019). Nesse sentido, no presente estudo, foram produzidos lipossomas com distribuição de tamanho entre 0,2 e 0,6, e, dessa forma, é indicado que há homogeneidade nas formulações (BASHIRI *et al.*, 2020; RAMEZANZADE *et al.*, 2021).

Quanto ao potencial zeta, todas as formulações apresentaram carga superficial positiva, devido à interação eletrostática dos grupos de ácidos graxos livres e o fosfato dos lipídeos que apresentam carga levemente negativa com a carga positiva dos grupamentos aminas da quitosana (NH_3^+), que, por sua vez, confere a carga superficial positiva para os lipossomas, favorecendo repulsão eletrostática mais forte entre as partículas, levando a uma melhor estabilidade desses nanocarreadores (NAHR *et al.*, 2018; BACHIRI *et al.*, 2020). Além disso, a quitosana possui capacidade mucoadesiva e, quando administrada por via oral, se adere à parede intestinal, possibilitando, por sua vez, o aumento do contato dos fármacos com o órgão, favorecendo, então, sua absorção pelas células do epitélio intestinal e aumento da sua biodisponibilidade (EZZAT *et al.*, 2019; SEYEDABADI *et al.*, 2021).

Todos os lipossomas apresentaram pH ácido, já que a quitosana é um polímero catiônico, que apresenta em sua estrutura química grupos amino na posição C₂ do anel de piranose da molécula, fator este que confere à formulação carga positivamente que por consequência ocasiona redução do pH da formulação (SHARILATINIA; JALALI, 2018).

A dissolução de formulações ácidas ou básicas podem ser dependentes do pH da formulação e do meio. As formulações básicas se dissolvem mais rapidamente no ambiente ácido do estômago, mas como seguem para um ambiente mais básico no intestino, sua solubilidade é reduzida, podendo resultar em precipitações de fármacos. Por sua vez, a dissolução de formulações ácidas é mínima no estômago e tende a aumentar conforme passa para um ambiente mais básico intestinal, influenciando diretamente na absorção dos fármacos. Para a administração oral, a absorção refere-se ao transporte dos fármacos através das membranas de células epiteliais do trato gastrointestinal, sendo as formulações ácidas melhor absorvidas no intestino (THANOU *et al.*, 2001; MARTINEZ *et al.*, 2002; ABUHELWA *et al.*, 2016). Em ocasiões em que a formulação está revestida por polissacarídeos, como a quitosana, o pH também pode influenciar na liberação do medicamento presente no nanocarreador, pois esses revestimentos são projetados para proteger a formulação do pH da mucosa gástrica, e que permitam apenas a liberação no intestino delgado (ABUHELWA *et al.*, 2017).

A administração de fármacos por vias não-parenterais, especialmente por via oral, representa um dos grandes desafios da indústria farmacêutica, uma vez que são

constantes problemas como baixa disponibilidade oral, inativação fisiológica, bem como baixa permeabilidade através do epitélio do trato gastrointestinal. Pensando-se nisso, várias abordagens como a nanotecnologia farmacêutica tem sido considerada para sobrepor essas limitações, sendo os lipossomas revestidos por polissacarídeos, como a quitosana, uma alternativa viável (NIU *et al.*, 2012; HE *et al.*, 2019).

5.1.2 Teor e eficiência de encapsulação de ceftazidima e ácido úsnico em lipossomas

O teor e a eficiência de encapsulação (%EE) de CAZ em Lipo-CAZ-Qui foi de $98,5 \pm 0,4\%$ e $51,5 \pm 0,2\%$, respectivamente. Outros estudos da literatura já encapsularam CAZ em lipossomas convencionais não revestidos com quitosana e obtiveram %EE variando de 5,77% a 50% (Tabela 1) (TORRES *et al.*, 2012; WIJESOORIYA *et al.*, 2013; FARZAMPANAH *et al.*, 2017).

Considerando que a ceftazidima tem característica hidrofílica (log P: -1,6), a mesma não se aprisiona na bicamada lipídica, e, por isso a mesma se direciona para o compartimento aquoso do lipossoma ou fica dispersa no líquido aquoso externo (WIJESOORIYA *et al.*, 2013; ZHOU *et al.*, 2019). A partir da comparação das %EE de CAZ nos lipossomas desenvolvidos nesse estudo e dos lipossomas já descritos na literatura, considera-se promissora a encapsulação de CAZ em lipossomas revestidos com quitosana, pois esse polissacarídeo pode interagir com o fármaco provocando um aumento na capacidade de encapsulação (CHEN *et al.*, 2016; ALSHAMSAN *et al.*, 2019; ALOMRANI *et al.*, 2019).

O teor de AU em Lipo-AU-Qui, por sua vez, foi de $98,9 \pm 0,3\%$, enquanto a %EE foi de $99,94 \pm 0,1\%$. Esses resultados demonstram a eficiência do método de encapsulamento utilizado nesse estudo. Além disso, dado a baixa solubilidade em água do AU, em decorrência da sua estrutura molecular e a formação de ligações intermoleculares do tipo de hidrogênio, o mesmo se inclui na bicamada lipídica, facilitando o processo de encapsulação (FRANCOLINI *et al.*, 2019; BATTISTA *et al.*, 2020). Esses resultados corroboram com dados já descritos na literatura encapsulando AU:

Lira *et al.* (2009) e Cavalcanti *et al.* (2018) observaram teor de AU acima de 90% e %EE próximo a 99% em lipossomas convencionais. Nunes *et al.* (2016)

encapsularam AU em membrana à base de gelatina contendo o lipossoma e encontraram %EE de 93,75% e Francolini *et al.* (2019) que encapsularam AU em lipossomas glicosilados obtendo %EE de 89%.

Um importante aspecto para o tratamento das infecções causadas por bactérias que induzem o CCR é a manutenção de uma quantidade de fármaco no local de ação por um período adequado (EZZAT *et al.*, 2019). Então, altos índices de teor e eficiência de encapsulação dos fármacos em formulações são aspectos essenciais para uma eficiente farmacoterapia (ALOMRANI *et al.*, 2019; SAĞIROĞLU, 2021).

O teor e a %EE de CAZ e AU em Lipo-CAZ-AU-Qui, foram de $98,3 \pm 0,1\%$ e $45,2 \pm 0,5\%$, e $98,7 \pm 0,6\%$ e $95,6 \pm 0,3\%$, respectivamente, enquanto no Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-QUI foi de $98,2 \pm 0,2\%$ e $50,7 \pm 0,3\%$ e $98,5 \pm 0,4\%$ e $98,9 \pm 0,5\%$, respectivamente. A EE% depende de alguns fatores, dentre eles, as propriedades do próprio lipossoma, bem como a interação entre os dois fármacos, assim a pequena perda na %EE, comparada a formulação encapsulando os fármacos isoladamente, é esperada, uma vez que a coencapsulação ocasiona um aglomerado de fármacos na vesícula lipossomal, aumentando sua saída dos lipossomas, além da possibilidade de repulsão entre os fármacos durante o processo de encapsulação (TORRES *et al.*, 2012; WIJESOORIYA *et al.*, 2013; RAN *et al.*, 2020).

A combinação de agentes antimicrobianos já é uma estratégia utilizada a décadas na prática clínica a fim de aumentar a eficácia, seja ela por ampliar o espectro antimicrobiano, reduzir a toxicidade, ou, ainda para fins de evitar o surgimento de cepas resistentes (EFTEKHARI *et al.*, 2019). Nesse sentido, utilizar lipossomas como carreadores de antibióticos contendo ambos os fármacos, seja na forma de coencapsulação ou na de mistura (*pool*), pode favorecer a distribuição controlada dos mesmos nos tecidos afetados, fortalecendo a sinergia (FARZAMPANA *et al.*, 2017; MENG *et al.*, 2021).

5.1.3 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e difração de raios-x (DRX) dos lipossomas

O FTIR das formulações Lipo-AU, Lipo-CAZ, lipossoma sem fármaco e sem quitosana (Lipo-NQui) e AU foi realizado a fim de avaliar a presença de grupos

funcionais críticos capazes de retratar a presença de bandas características do AU, CAZ e conteúdo lipídico (Figura 18).

Nesse sentido, no espectro de FTIR das formulações lipossomais, houve um pico em 2855 e 3290 cm^{-1} indicando a presença de ligações de hidrogênio, que representam as principais interações macromoleculares como as de fosfolipídeos, correspondendo ao alongamento simétrico CH_2 e O-H, respectivamente (YOKOTA *et al.*, 2012). Os picos em 1233 e 1735 cm^{-1} corresponderam aos grupos fosfato ($\text{P}=\text{O}$) e éster ($\text{C}=\text{O}$), ambos presentes na extremidade polar da estrutura dos fosfolipídeos, e, em 2924 e 2854 cm^{-1} , por sua vez, indicaram a presença da cadeia hidrofóbica dos mesmos (UMAR *et al.*, 2021).

No espectro de Lipo-CAZ, as bandas de deformação axial, nas regiões entre 3290-2924 cm^{-1} corresponderam aos grupamentos químicos OH e NH, característicos de compostos cefalosporínicos, a deformação axial em 1367 cm^{-1} indica a presença das ligações C-N dos anéis aromáticos, e, em 1736 cm^{-1} é referente ao grupo amida (DAFALE *et al.*, 2012). As ligações C-H e C=O presentes no anel β -lactâmico são visualizadas em 2924 e 1753 cm^{-1} . Além disso, observou-se uma mudança de intensidade dos picos entre 1736 e 1367 cm^{-1} , indicando que houve interação entre o lipossoma e a CAZ (OSÓRIO *et al.*, 2018).

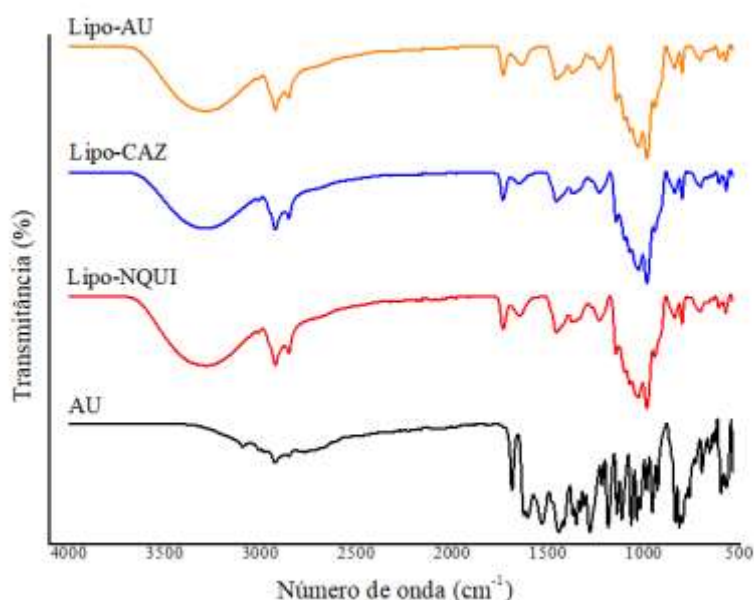


Figura 18. Espectros de FTIR dos lipossomas sem revestimento de quitosana (Lipo-AU, Lipo-CAZ, Lipo-NQui) e ácido úsnico (AU).

O espectro de AU, por sua vez, mostrou picos característicos em 1690 e 1067

cm^{-1} conforme previamente relatado na literatura (NUNES *et al.*, 2010). Possíveis ligações de hidrogênio intramoleculares contribuíram para posição de menor comprimento de onda da metilcetona aromática em 1627 cm^{-1} . As vibrações do grupamento cetona cíclico conjugado estão em 1690 cm^{-1} , além de bandas antisimétricas em 1187 cm^{-1} correspondentes às ligações C-O-C (MAULIDIYAH *et al.*, 2021). No espectro de Lipo-AU, bandas semelhantes do AU foram observadas, indicando que a incorporação no lipossoma não alterou a estabilidade do fármaco. Ademais, modificações na intensidade e forma dos picos em 1735 e 1234 cm^{-1} indicaram a interação entre o AU e o lipossoma (LIRA *et al.*, 2009).

Na Figura 19 estão retratados os espectros de FTIR das formulações com o revestimento de quitosana, sendo elas Lipo-Qui, Lipo-CAZ-Qui, Lipo-AU-Qui, Lipo-CAZ-AU-Qui e Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-Qui, e quitosana.

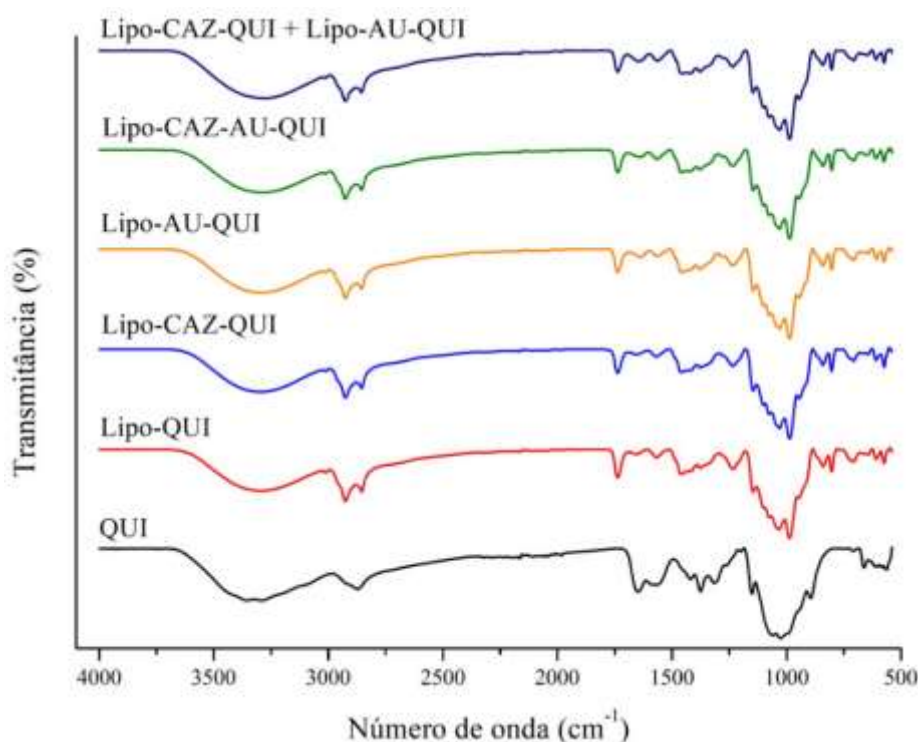


Figura 19. Espectros de FTIR dos lipossomas com revestimento de quitosana (Lipo-Qui, Lipo-AU-Qui, Lipo-CAZ-Qui, Lipo-CAZ-AU-Qui, Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-Qui) e quitosana (Qui).

Após o revestimento dos lipossomas com a Qui (Lipo-Qui), o pico lipídico característico em 1735 cm^{-1} modificou para valores com frequência mais baixos (1733

cm^{-1}), indicando a possível formação de novas ligações de hidrogênio (HASAN *et al.*, 2016). A interação entre o grupo fosfato presente nos fosfolipídeos com a Qui resultou na remoção de água do mesmo, deslocando a banda para uma frequência mais alta em 1981 cm^{-1} . As vibrações de estiramento de N-O foram aparentes em 3355 cm^{-1} no espectro de Qui, o qual modificou para uma frequência mais baixa (3289 cm^{-1}) nos espectros dos lipossomas revestidos com quitosana (WANG *et al.*, 2017). O pico de flexão N-H no espectro de FTIR de Qui (1575 cm^{-1}) foi modificado para 1566 cm^{-1} no espectro de Lipo-Qui, sugerindo a interação eletrostática entre os grupos amina da Qui e os fosfatos do lipossoma. Esses dados corroboram com os estudos de HAMEDINASAB *et al.* (2020) que também observaram esses picos ao revestir com quitosana lipossomas contendo N-acetilcisteína.

No espectro de Lipo-CAZ-Qui observou-se uma banda na $3011\text{-}3292 \text{ cm}^{-1}$ referente aos grupamentos =C-H, N-H e O-H, além de um alongamento em 1736 cm^{-1} , referente à presença da ligação entre C=O, sendo isso atribuído a associação desse grupo com o grupo presente na cabeça polar da bicamada lipídica. Um outro alongamento foi visualizado em 1566 cm^{-1} referente à deformação axial do grupo C=C, deformação axial em 1100 cm^{-1} formada pela C-O, e em $609\text{-}803 \text{ cm}^{-1}$ formados pelas deformações de hidrogênio (OSÓRIO *et al.*, 2018). Nos espectros de Lipo-CAZ-AU-Qui e Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-Qui, foram evidenciados o deslocamento dos picos de 1566 para 1564 cm^{-1} (Lipo-CAZ-AU-Qui), 1736 para 1735 cm^{-1} e 1566 para 1562 cm^{-1} (Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-Qui). Apesar desses deslocamentos, os espectros são semelhantes ao Lipo-Qui, sugerindo-se que a CAZ foi encapsulada com sucesso na região hidrofílica dos lipossomas (HUANG *et al.*, 2019; FEUSER *et al.*, 2021).

O espectro de Lipo-AU-Qui, por sua vez, observou-se picos característicos da presença do AU em 1637 e em 1075 cm^{-1} , sendo estes equivalentes às vibrações de C=O de amidas e deformações axiais do tipo C-O de ésteres. Além disso, foram evidenciadas vibrações de deformação axiais em 2924 cm^{-1} devido à C-H primários ou secundários, deformações angulares em 1033 a 1146 cm^{-1} equivalente a C-O de álcool primário e terciário, respectivamente (SOMASEKHAR *et al.*, 2021). Foi observado, ainda que houve o deslocamento da banda em Lipo-CAZ-AU-Qui de 1637 para 1642 cm^{-1} e 1100 para 1099 cm^{-1} , e de 1637 para 1644 para Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-Qui.

Assim, na Figura 20, é possível observar que em todos os lipossomas são evidenciadas bandas de absorção características da quitosana e dos lipídeos,

contudo, nas formulações contendo o AU e a CAZ, percebem-se deslocamentos de bandas, sugerindo a interação com a quitosana e a eficaz encapsulação dessas moléculas.

Estudos de difração de raios X foram realizados para investigar a microestrutura do fármaco, dos fosfolipídios e da quitosana e suas interações com os lipossomas desenvolvidos. Assim, na figura 20, está evidenciado o DRX para as formulações sem o revestimento de quitosana (Lipo-AU, Lipo-CAZ, Lipo-NQui) e AU. Como esperado, o AU puro exibiu todos os picos característicos esperados para cristais de AU, que estavam localizados na faixa de diferentes valores de 2θ , tais como $10,3^\circ$, $14,5^\circ$, $18,6^\circ$, $22,7^\circ$, $24,3^\circ$ e $27,4^\circ$, sendo estes todos de acordo com o relatado anteriormente em outros estudos (LIRA *et al.*, 2009; KHAN *et al.*, 2020).

O difratograma de Lipo-NQui exibiu apenas um único pico amplo, com um valor máximo em torno de $2\theta = 21^\circ$. Contudo, após a encapsulação do AU no lipossoma, os padrões de DRX mudaram consideravelmente comparado ao AU livre, o que indica o caráter amorfo da amostra, sendo isso explicado devido a formação de um sistema com menor organização, com a formação de interações moleculares entre o AU e o lipossoma (LIRA *et al.*, 2009; QU *et al.*, 2018). O Lipo-CAZ, por sua vez, demonstrou um pico em $2\theta = 25^\circ$, contudo, este não é correspondente ao previamente descrito na literatura para CAZ (2θ de $20,2^\circ$, $21,5^\circ$, $22,3^\circ$), indicando o grau de cristalinidade dos lipossomas, assim como as possíveis ligações de hidrogênio, ou interações eletrostáticas entre o fármaco e os lipídeos (PEREIRA, 2019).

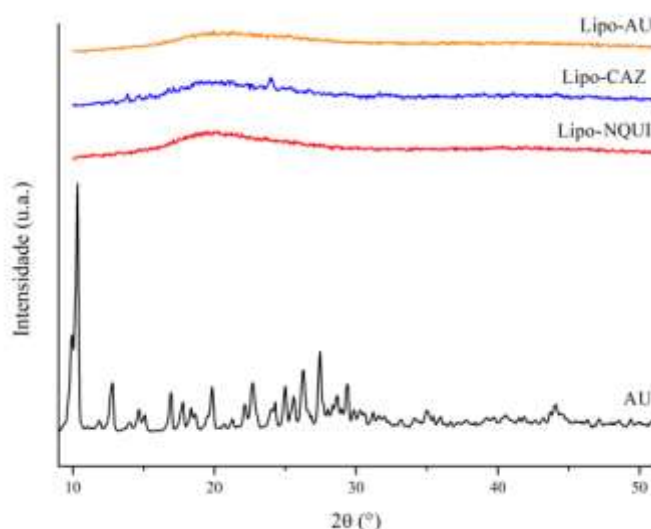


Figura 20. DRX dos lipossomas sem fármaco e sem quitosana (Lipo-NQui), com ácido úsnico (Lipo-AU) e com ceftazidima (Lipo-CAZ), e do ácido úsnico livre (AU).

Na Figura 21, por sua vez, está evidenciado o DRX das formulações com o revestimento de quitosana (Lipo-Qui, Lipo-AU-Qui, Lipo-CAZ-Qui, Lipo-CAZ-AU-Qui, Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-Qui), além da Qui. A Qui, exibiu picos correspondentes com estudos anteriores, tais como o pico em torno de $2\theta = 20^\circ$, correspondentes às formas cristalinas do tipo α e β , que indicam as características típicas desse polímero em estado semicristalino (LIU *et al.*, 2015; KHAN *et al.*, 2020).

O difratograma de Lipo-Qui exibiu um pico de baixa intensidade em torno de $2\theta = 20^\circ$, indicando a presença de interações químicas entre os componentes e a quitosana. Por outro lado, os demais difratogramas consistiram em uma sobreposição dos padrões individuais dos componentes principais, os fosfolipídeos e a quitosana, com ocultação dos picos que caracterizam a CAZ e o AU, sugerindo amorfização/dispersão destes no lipossoma (CADDEO *et al.*, 2016; HUANG *et al.*, 2020).

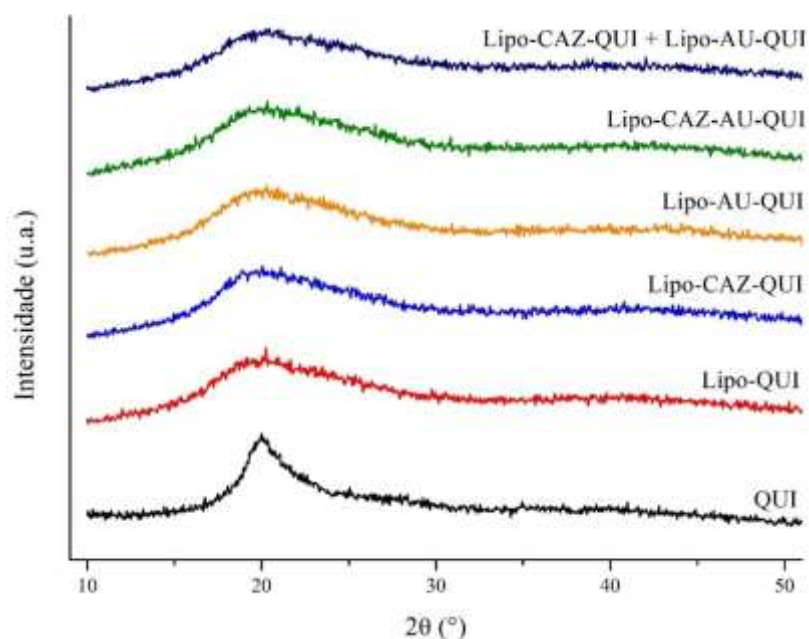


Figura 21. DRX dos lipossomas com o revestimento por quitosana (Lipo-Qui, Lipo-AU-Qui, Lipo-CAZ-Qui, Lipo-CAZ-AU-Qui, Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-Qui), e da quitosana (Qui).

5.1.4 Análises térmicas por termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial dos lipossomas

A Figura 22 mostra as curvas termogravimétricas de Lipo-NQui, Lipo-CAZ, Lipo-AU e do AU. No Lipo-NQui, a primeira etapa foi exibida com perda de peso mínima (2,6%) na faixa de temperatura de 25 a 232 °C, sendo isso justificado à presença de água residual nas amostras e substâncias de baixo peso molecular. Por outro lado, a segunda etapa ocorre entre 200 e 290 °C, onde ocorreu a maior perda de peso das amostras (82,2%), referindo à degradação dos lipídeos. A terceira etapa, aconteceu em temperaturas acima as de 300 °C, com a decomposição adicional dos constituintes da formulação (PAN *et al.*, 2020).

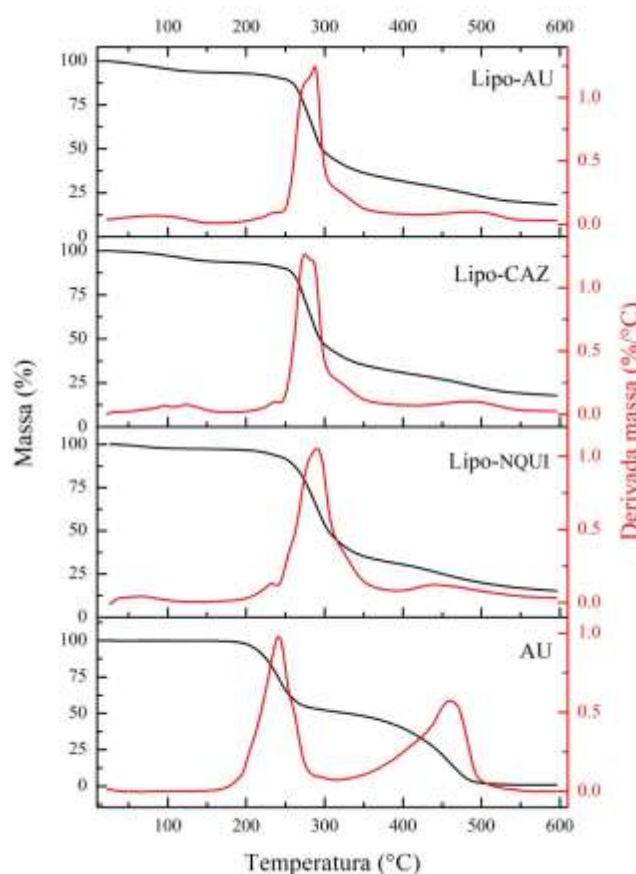


Figura 22. Termograma dos lipossomas sem quitosana (Lipo-NQui), com ácido úsnico (Lipo-AU) e com ceftazidima (Lipo-CAZ), e do ácido úsnico livre (AU).

Já no Lipo-CAZ e Lipo-AU, a primeira perda de massa ocorre entre 25 e 124 °C, e 25 e 81°C, com perda média de 6,2 e 6,5%, respectivamente, a segunda perda, por sua vez, ocorre em 275°C e 288°C, com perda de 75,9 e 7,2%, pontos esses onde há degradação dos fármacos. A terceira etapa, por sua vez, ocorreu em temperaturas acima de 488 e 494 °C, sendo isso, possivelmente ocorrido através da degradação

final dos fármacos e dos demais constituintes da formulação (PAN *et al.*, 2020). Segundo a literatura, a CAZ apresenta perda de massa, de em média 10%, em intervalos de temperatura entre 50 e 100 °C, e cerca de 75% desta perde massa em temperaturas acima de 190 °C (SANTANA *et al.*, 2020). O AU, por sua vez, de acordo com o seu termograma perde massa de 48,8% em temperaturas entre 25 e 241 °C, e cerca de 50,4% em temperaturas superiores a 459 °C. Assim, pode-se notar que as formulações lipossomais exibiram melhor estabilidade térmica quando comparado com os fármacos livres (NKANGA *et al.*, 2017).

Por sua vez, a Figura 23, está evidenciado o termograma das formulações com o revestimento de quitosana (Lipo-Qui, Lipo-AU-Qui, Lipo-CAZ-Qui, Lipo-CAZ-AU-Qui, Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-Qui), além da Qui. As curvas termogravimétricas obtidas desses lipossomas, demonstraram uma perda de massa inicial até 226 °C em torno de 7% para Lipo-Qui, 6,1% para Lipo-CAZ-Qui, 6,5% para Lipo-AU-Qui, 6,8% para Lipo-CAZ-AU-Qui e 14,1% para Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-Qui. e uma perda de $\geq 62,2\%$ com temperaturas superiores a 285 °C. A Qui, por sua vez, teve uma perda inicial de 11,62% em 35 °C, e mais 87% em 285 °C na segunda etapa, e 1,1% acima de 514°C, sendo este dado de acordo com o previamente descrito na literatura (MOUSSOUT, 2016).

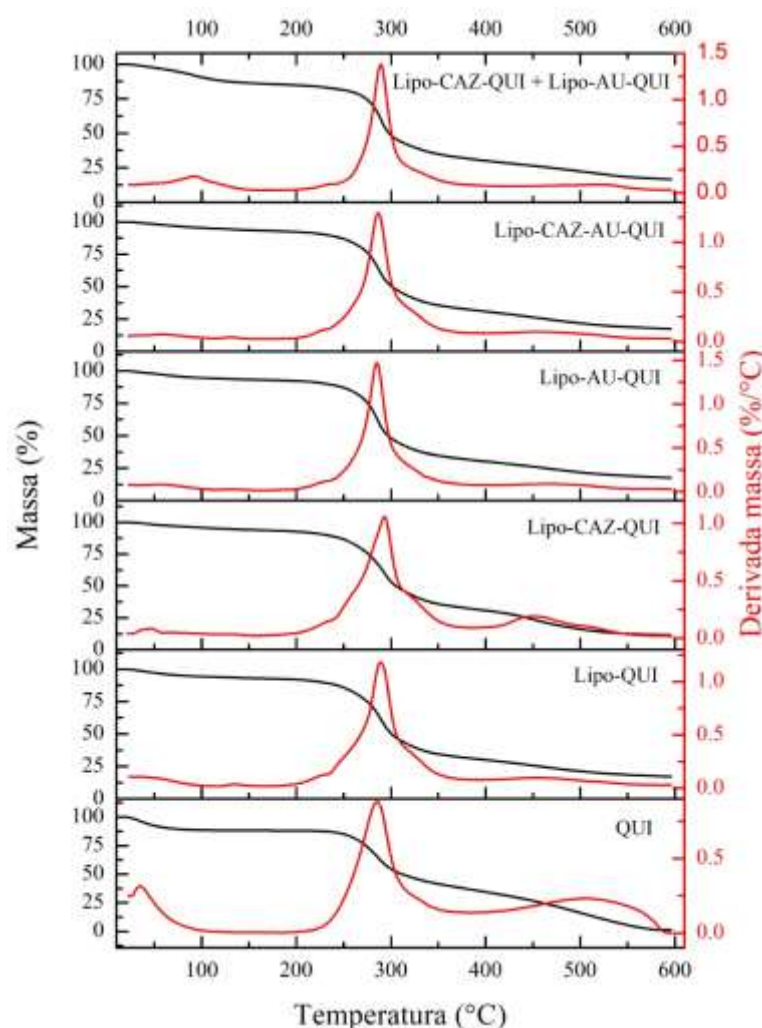


Figura 23. Termograma dos lipossomas com o revestimento por quitosana (Lipo-Qui, Lipo-AU-Qui, Lipo-CAZ-Qui, Lipo-CAZ-AU-Qui, Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-Qui), e da quitosana (Qui).

Esse perfil de perda de massa apresentado pelos lipossomas desenvolvidas neste estudo é distinto do descrito na literatura, tanto ao previamente descrito para os fármacos e evidenciam que não há perda significativa de massa em temperaturas entre 25°C e 226°C, evidenciando a eficiente encapsulação da CAZ e AU (NIAZ *et al.*, 2018).

No termograma de DSC, exibido na figura 24, os lipossomas apresentaram picos endotérmicos, Lipo-NQui em 86,4, 94,4 e 128,5 °C, Lipo-CAZ em 86,1 e 159,1°C, Lipo-AU em 117,4 e 144,7 °C, enquanto o AU livre apresentou picos em 199,4 e 202,9°C. De acordo com a literatura, a CAZ apresenta picos em 120°C, enquanto o AU tem pico de fusão em 201,5, 204 e 273 °C (LIRA *et al.*, 2009;

SANTANA *et al.*, 2020). Nesse sentido, observa-se que os picos correspondentes à degradação dos fármacos não foram evidenciados, sugerindo-se que a CAZ e o AU encapsulado nos lipossomas promoveu melhorias na estabilidade térmica dos mesmos (NKANGA *et al.*, 2017).

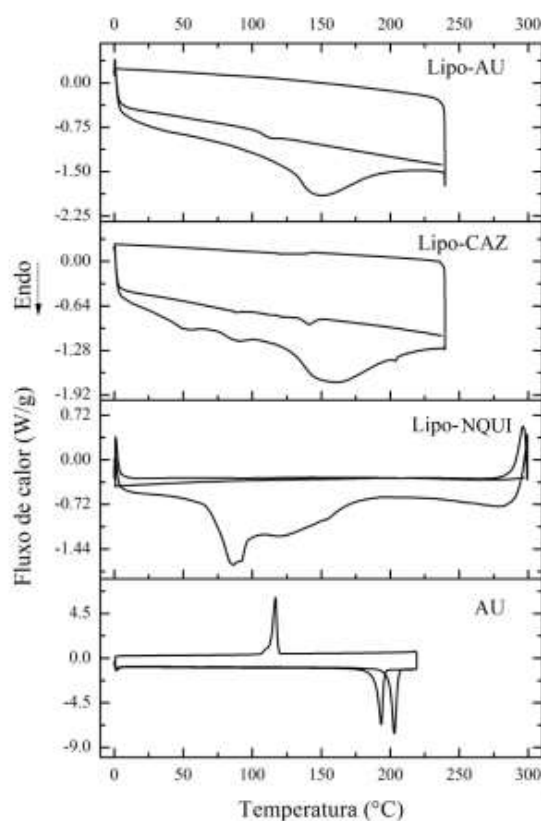


Figura 24. DSC dos lipossomas sem quitosana (Lipo-NQui), com ácido úsnico (Lipo-AU) e com ceftazidima (Lipo-CAZ), e do ácido úsnico livre (AU).

A Figura 25 demonstra o DSC das formulações com o revestimento de quitosana (Lipo-Qui, Lipo-AU-Qui, Lipo-CAZ-Qui, Lipo-CAZ-AU-Qui, Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-Qui), além da Qui. Os picos endotérmicos para Lipo-Qui foram em 77,6 e 131,18 °C, Lipo-CAZ-Qui em 86,1 e 106,4 °C, Lipo-AU em 151 °C, Lipo-CAZ-AU-Qui em 83,1 e 121,9 °C, e Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-Qui em 150 °C. Autores indicam que a quitosana é caracterizada por um pico endotérmico próximo de 100 °C, seguido por um exotérmico em torno de 270 °C (LUO *et al.*, 2011).

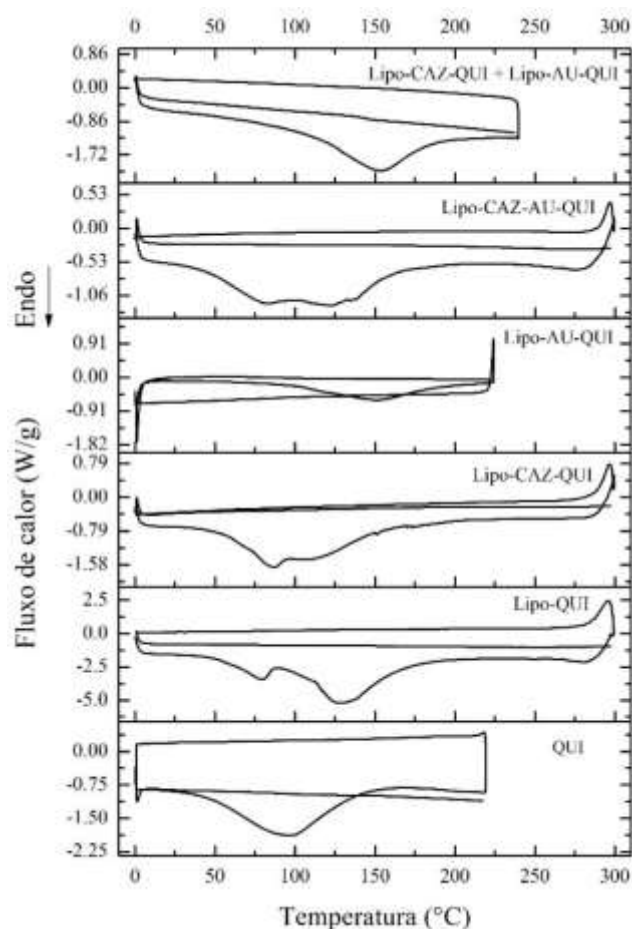


Figura 25. DSC dos lipossomas com o revestimento por quitosana (Lipo-Qui, Lipo-AU-Qui, Lipo-CAZ-Qui, Lipo-CAZ-AU-Qui, Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-Qui), e da quitosana (QUI).

No que diz respeito à análise dessas formulações, os primeiros picos costumam estarem relacionados com a perda inicial de água, atribuindo-se isso a presença de grupos hidrofílicos tanto nos lipídeos quanto na quitosana. Ademais, os picos característicos de CAZ e AU não se fizeram presentes no termograma, sugerindo uma interação entre os mesmos e a estrutura do lipossoma. Nesse sentido, foi possível verificar uma melhoria da estabilidade térmica das formulações quando comparadas com as formulações sem o revestimento com quitosana, visto que foram evidenciadas mudanças na temperatura de fusão, devido à proteção exercida pela quitosana frente à degradação térmica para os fármacos (NIAZ *et al.*, 2018).

5.1.5 Estabilidade dos lipossomas em condições de pH gastrointestinais simuladas

Uma vez que no presente estudo os lipossomas desenvolvidos foram preparados para futura administração oral, estes nanocarreadores poderiam sofrer variações no processo de passagem pelo trato gastrointestinal humano, portanto é fundamental estudar a influência do pH nas suas propriedades físico-químicas, a fim de inferir sua estabilidade. Assim, após serem submetidas a exposição em pH 1,2, Lipo-Qui sofreram pequenas alterações após 120 minutos, onde apresentaram $\emptyset$ de $96,3 \pm 1,2$ nm, PDI de 0,414 e ζ de $+8,4 \pm 0,3$ mV, Lipo-CAZ-Qui, por sua vez, exibiu $121,3 \pm 1,1$ nm, PDI de 0,371 e $+10,3 \pm 0,9$ mV, Lipo-AU-Qui apresentou $207,3 \pm 14,9$ nm, PDI de 0,619, e $+8,7 \pm 1,3$ mV, Lipo-CAZ-AU-Qui, apresentou $203,1 \pm 2,1$ nm, PDI de 0,485 e $+14,1 \pm 0,1$ mV, e, por fim, o Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-Qui demonstrou $146,9 \pm 6,1$ nm, PDI de 0,556 e $+9,7 \pm 0,3$ mV (Tabela 2).

Tabela 3. Estudo de estabilidade em pH gástrico simulado (pH 1,2) das dispersões de Lipo-Qui, Lipo-CAZ-Qui, Lipo-AU-Qui, Lipo-CAZ-AU-Qui e Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-Qui.

Formulação	Tempo	Ø (nm)	PDI	ζ (mV)
Lipo-Qui	30 min	89,3 ± 2,3	0,400	+9,32 ± 0,3
	60 min	92,4 ± 2,5	0,409	+9,53 ± 0,4
	90 min	95,7 ± 1,7	0,425	+8,6 ± 0,1
	120 min	96,2 ± 1,2	0,414	+8,4 ± 0,3
Lipo-CAZ-Qui	30 min	115,1 ± 1,3	0,366	+12,8 ± 0,5
	60 min	116,6 ± 1,3	0,392	+12,7 ± 0,5
	90 min	117,7 ± 0,5	0,382	+11,7 ± 0,8
	120 min	121,3 ± 1,1	0,371	+10,3 ± 0,9
	30 min	171,3 ± 1,9	0,512	+11,3 ± 1,1

Lipo-AU-Qui	60 min	185,8 ± 2,8	0,552	+10,8 ± 0,3
	90 min	168 ± 7,9	0,554	+11,1 ± 1,6
	120 min	207,3 ± 14,9	0,619	+8,7 ± 1,3
Lipo-CAZ-AU-Qui	30 min	199,3 ± 1,4	0,461	+18,7 ± 0,4
	60 min	198,4 ± 1,2	0,469	+18,7 ± 0,5
	90 min	200,2 ± 1,5	0,482	+16,5 ± 1,4
	120 min	203,1 ± 2,1	0,485	+14,1 ± 0,1
Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-Qui	30 min	192,3 ± 1,6	0,596	+9,5 ± 0,6
	60 min	178,8 ± 2,2	0,549	+9,1 ± 0,3
	90 min	154,5 ± 1,8	0,552	+10,3 ± 0,1
	120 min	146,9 ± 6,1	0,556	+9,7 ± 0,3

Ø: Tamanho de partícula; PDI: Índice de polidispersão; ζ: Potencial zeta; Lipo-CAZ-Qui: Lipossomas revestidos com quitosana encapsulando CAZ; Lipo-AU-Qui: Lipossomas revestidos com quitosana encapsulando AU; Lipo-CAZ-AU-Qui: Lipossomas revestidos com quitosana coencapsulando CAZ e AU; Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-Qui: Amostra *Pool*.

Levando em consideração os resultados apresentados, todos os lipossomas se demonstraram estáveis durante a exposição em pH 1,2, que mimetiza o pH gástrico, entre o intervalo de tempo de 30 a 120 minutos. Logo, notou-se que as formulações obtiveram pequena redução no tamanho de partícula e pequeno aumento do PDI, sendo atribuído ao fato da quitosana apresentar solubilidade em condições ácidas, cuja carga positiva em pHs abaixo do seu pKa (pH 6,5) tornam seus grupos amino carregados ($-\text{NH}_3^+$), e com isso há uma redução da osmolaridade interna em comparação com o ambiente externo, resultando em diferenças de pressão osmótica que pode levar ao vazamento da água presente no núcleo dos lipossomas para a fase externa, induzindo o encolhimento da membrana lipossomal e diminuição do seu tamanho, assim como aumentando a polidispersão entre as partículas (LIU *et al.*, 2016; ZHOU *et al.*, 2021).

A fim de fornecer outras informações adicionais sobre o mecanismo de estabilidade dos lipossomas, a carga superficial também foi determinada no pH 1,2. Assim notou-se também uma redução nesse parâmetro, possivelmente decorrente à liberação parcial da quitosana da superfície lipossomal em condições ácidas, que reduz discretamente os valores de potencial zeta (CHEN *et al.*, 2013; HI; HUANG, 2021). Portanto, uma vez que os lipossomas desenvolvidos nesse estudo se mostraram estáveis em condições ácidas, eles são capazes de suportar a condição ácida do estômago e evitar a liberação do fármaco encapsulado nessa região.

Em pH 6,8, a fim de mimetizar o pH intestinal, as formulações de Lipo-Qui sofreram algumas alterações após 120 minutos de exposição, onde apresentaram $\emptyset$ de $109,4 \pm 1,5$ nm, PDI de 0,413 e ζ de $+6,4 \pm 0,9$ mV, Lipo-CAZ-Qui, por sua vez, exibiu $125 \pm 5,7$ nm, PDI de 0,401 e $+6,2 \pm 0,4$ mV, Lipo-AU-Qui apresentou $262,6 \pm 10,1$ nm, PDI de 0,685, e $+6,5 \pm 0,2$ mV, Lipo-CAZ-AU-Qui, apresentou $256,9 \pm 2,6$ nm, PDI de 0,497 e $+8,3 \pm 0,2$ mV, e, por fim, o Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-Qui demonstrou $247 \pm 6,1$ nm, PDI de 0,521 e $+8,3 \pm 0,5$ mV (Tabela 3).

Tabela 4. Estudo de estabilidade em pH intestinal simulado (pH 6,8) das dispersões de Lipo-Qui, Lipo-CAZ-Qui, Lipo-AU-Qui, Lipo-CAZ-AU-Qui e Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-Qui.

Formulação	Tempo	Ø (nm)	PDI	ζ (mV)
Lipo-Qui	30 min	109,5 ± 0,7	0,436	+4,6 ± 0,4
	60 min	109,8 ± 2,5	0,419	+5,3 ± 1,1
	90 min	110,7 ± 1,7	0,412	+5,7 ± 0,4
	120 min	109,4 ± 1,5	0,413	+6,4 ± 0,9
Lipo-CAZ-Qui	30 min	123,1 ± 2,9	0,381	+5,4 ± 0,2
	60 min	126,9 ± 2,5	0,382	+5,9 ± 0,3
	90 min	127,1 ± 1,4	0,410	+6,5 ± 0,5
	120 min	125,0 ± 5,7	0,401	+6,2 ± 0,4
	30 min	257,6 ± 7,1	0,576	+7,1 ± 0,3

Lipo-AU-Qui	60 min	234 ± 9,1	0,573	+7,4 ± 1,2
	90 min	233,9 ± 12,1	0,646	+6,2 ± 0,1
	120 min	262,6 ± 10,1	0,685	+6,5 ± 0,2
Lipo-CAZ-AU-Qui	30 min	263,5 ± 4,7	0,490	+7,4 ± 0,4
	60 min	277,6 ± 1,1	0,500	+7,9 ± 0,6
	90 min	269,4 ± 4,0	0,487	+7,4 ± 0,4
	120 min	256,9 ± 2,6	0,497	+8,3 ± 0,2
Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-Qui	30 min	253,4 ± 2,1	0,569	+7,5 ± 0,5
	60 min	235,5 ± 5,4	0,599	+7,4 ± 0,2
	90 min	244,9 ± 9,1	0,486	+7,4 ± 0,3
	120 min	247 ± 6,1	0,521	+8,3 ± 0,5

Ø: Tamanho de partícula; PDI: Índice de polidispersão; ζ: Potencial zeta; Lipo-CAZ-Qui: Lipossomas revestidos com quitosana encapsulando CAZ; Lipo-AU-Qui: Lipossomas revestidos com quitosana encapsulando AU; Lipo-CAZ-AU-Qui: Lipossomas revestidos com quitosana coencapsulando CAZ e AU; Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-Qui: Amostra *Pool*.

Após a exposição ao pH intestinal simulado (pH 6,8), houve um aumento no tamanho das partículas dos lipossomas, bem como redução do potencial zeta, possivelmente devido a solução está acima do pKa dos grupos amino da quitosana, assim, havendo uma desprotonação dos grupos NH_3^+ , levando a um aumento na agregação coloidal das partículas, que, por sua vez, resulta no aumento do diâmetro e redução na carga de superfície (ZHANG *et al.*, 2021; MA *et al.*, 2022).

Outros estudos comprovaram essas mesmas alterações nesses parâmetros após a exposição de lipossomas revestidos por quitosana em pHs simulado do trato gastrointestinal, como Zhou *et al.* (2021) com a encapsulação da curcumina em lipossomas revestidos por quitosana para fins nutracêuticos, e Hi e Huang (2021) com lipossomas revestidos com quitosana para transporte de albumina sérica bovina para administração oral de proteínas. Logo, Lipo-CAZ-Qui, Lipo-AU-Qui, Lipo-CAZ-AU-QUI e Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-Qui demonstram estabilidade em condições

gastrointestinais simuladas, possibilitando sua aplicação como sistemas de entrega intestinais de antimicrobianos orais.

5.1.6 Estabilidade das dispersões lipossomais

As formulações Lipo-CAZ-Qui, Lipo-AU-Qui e Lipo-CAZ-AU-Qui foram acompanhadas quanto a estabilidade em dispersão por até 120 dias armazenadas a 2 °C e sofreram pequenas alterações de suas propriedades, onde Lipo-CAZ-Qui apresentou $201,8 \pm 2$ nm, PDI de 0,620, ζ de $+9,1 \pm 2,3$ mV e pH 4,5, Lipo-AU-Qui exibiu $303,5 \pm 6,4$ nm, PDI de 0,726, $+7,8 \pm 3,1$ mV e pH 4, e, por fim, Lipo-CAZ-AU-Qui apresentou $345,1 \pm 2$ nm, PDI de 0,526, $+9,1 \pm 2$ mV e pH 4,6 (Tabela 4). O teor e %EE também se mantiveram estáveis por 120 dias, onde em Lipo-CAZ-QUI apresentou $40,2 \pm 0,7\%$, Lipo-AU-Qui $80,1 \pm 0,6\%$, e Lipo-CAZ-AU-Qui $38,4 \pm 0,6\%$ (CAZ) e $79,2 \pm 0,1\%$ (AU), respectivamente.

Tabela 5. Estudo de estabilidade a 2 °C das dispersões de Lipo-CAZ-Qui, Lipo-AU-Qui e Lipo-CAZ-AU-Qui.

Formulação	Tempo (dias)	Ø (nm)	PDI	ζ (mV)	pH	Teor (%)	%EE
Lipo-CAZ-Qui	7	$118,4 \pm 4,3$	0,412	$+17,6 \pm 1,0$	5,2	$98,1 \pm 0,2$	$50,9 \pm 0,5$
	14	$121,7 \pm 2,6$	0,406	$+15,9 \pm 2,4$	5,1	$97,4 \pm 0,6$	$48,7 \pm 0,8$
	30	$135,4 \pm 5,6$	0,501	$+14,2 \pm 3,1$	5,1	$95,2 \pm 1$	$47,4 \pm 0,2$
	60	$159,9 \pm 7,1$	0,612	$+12,5 \pm 3,5$	4,5	$95,1 \pm 0,9$	$45,4 \pm 0,5$
	120	$201,8 \pm 2$	0,620	$+9,1 \pm 2,3$	4,5	$95,4 \pm 1$	$40,2 \pm 0,7$

Lipo-AU-Qui	7	141,3 ± 4,3	0,456	+24,6 ± 2,2	5,0	95,1 ± 1,2	99,9 ± 0,3
	14	149,5 ± 2,4	0,474	+27,9 ± 3,1	5,5	94,8 ± 1,8	99,1 ± 0,1
	30	212,5 ± 5,9	0,636	+15,8 ± 4,5	4,8	94,2 ± 1,5	90,2 ± 1,0
	60	289,9 ± 7,1	0,714	+8,5 ± 5,2	4	94,5 ± 0,9	86,4 ± 0,1
	120	303,5 ± 6,4	0,726	+7,8 ± 3,1	4	92,7 ± 0,2	80,1 ± 0,6
Lipo-CAZ-AU-Qui	7	235,2 ± 7,4	0,419	+19,1 ± 4,3	5,0	98,1 ± 0,5 (CAZ)	45,1 ± 0,2 (CAZ)
						96,9 ± 0,5 (AU)	94,9 ± 0,4 (AU)
	14	259,1 ± 6,1	0,456	+18,4 ± 1	5,0	97,9 ± 0,2 (CAZ)	44,2 ± 0,5 (AU)
						96,5 ± 1 (AU)	94,5 ± 1 (AU)
	30	256,4 ± 2,4	0,471	+17,1 ± 2,2	4,9	95,8 ± 0,1 (CAZ)	42,4 ± 1 (CAZ)
						96,2 ± 0,1 (AU)	91,9 ± 0,2 (AU)
	60	330,5 ± 7	0,519	+9,2 ± 2,1	4,7	94,3 ± 0,4 (CAZ)	41,5 ± 0,5 (CAZ)

Lipo-CAZ- Qui + Lipo- AU-Qui						91,2 ± 0,4 (AU)	79,2 ± 0,1 (AU)
	120	345,1 ± 2	0,526	+9,1 ± 2	4,6	92,6 ± 0,3 (CAZ)	38,4 ± 0,6 (CAZ)
	7	232,4 ± 2,5	0,632	+19,3 ± 1,6	5	91,2 ± 0,6 (CAZ)	45,6 ± 2,1 (CAZ)
						97,5 ± 1 (AU)	91,5 ± 0,1 (AU)
	14	267,1 ± 3,1	0,684	+15,4 ± 2,6	4,8	92,3 ± 0,7 (CAZ)	39,6 ± 1,2 (CAZ)
						98,2 ± 1,8 (AU)	71,3 ± 0,4 (AU)
	30	281,4 ± 1,8	0,696	+11,1 ± 3,4	4,8	90,1 ± 1,6 (CAZ)	38,7 ± 0,1 (CAZ)
						99,1 ± 1 (AU)	70,4 ± 1,4 (AU)
	60	304,6 ± 6,4	0,701	+7,1 ± 0,6	4	90,6 ± 1 (CAZ)	30,1 ± 2 (CAZ)
						96,4 ± 0,2 (AU)	68,1 ± 3 (AU)
	120	326,2 ± 2,7	0,821	+4,1 ± 1	3,6	92,4 ± 2,6 (CAZ)	25,1 ± 0,2 (CAZ)
						94,9 ± 0,9 (AU)	54,6 ± 1,2 (AU)

Ø: Tamanho de partícula; PDI: Índice de polidispersão; ζ: Potencial zeta; %EE: Eficiência de encapsulação; Lipo-CAZ-Qui: Lipossomas revestidos com quitosana encapsulando CAZ; Lipo-AU-Qui: Lipossomas revestidos com quitosana

encapsulando AU; Lipo-CAZ-AU-Qui: Lipossomas revestidos com quitosana coencapsulando CAZ e AU; Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-Qui: Amostra *Pool*.

Garantir que a formulação permaneça estável sob condições de armazenamento é importante, pois ela deve conservar suas características sem que haja extravasamento do fármaco, oxidação, fusão de vesículas que podem formar partículas maiores, podendo influenciar no desempenho *in vivo* da formulação (TIAN *et al.*, 2018). As formulações de Lipo-CAZ-Qui, Lipo-AU-Qui e Lipo-CAZ-AU-Qui se apresentaram estáveis em suspensão em torno de 30 dias (Tabela 1). Após esse período, as formulações apresentaram aumento de $\emptyset$ e PDI, além de queda no ζ e pH. Contudo, nenhuma das formulações em dispersão apresentou agregado, precipitação de fármaco ou separação de fases nos 120 dias do estudo de estabilidade. Assim, apesar dessas pequenas alterações, as propriedades físico-químicas das formulações permaneceram compatíveis para a administração por via oral.

5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A avaliação da atividade antibacteriana dos lipossomas revestidos com quitosana contendo CAZ, AU ou CAZ+AU (Lipo-CAZ-Qui, Lipo-AU-Qui, Lipo-CAZ-AU-Qui), assim como do *pool* Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-Qui, é pioneira, frente à cepa que podem induzir o CCR, como por exemplo *E. coli* ATCC 25922, NCTC 13846 e H10407 (Tabela 3). Os resultados demonstraram que a CAZ apresentou CIM de 1,95 µg/mL para todas as cepas testadas e AU apresentou CIM de 500 µg/mL para *E. coli* ATCC 25922, 1000 µg/mL para *E. coli* NCTC 13846 e 250 µg/mL para *E. coli* H10407. A CBM de CAZ foi de 1,95 µg/mL e AU 1000 µg/mL para todas as cepas testadas.

Lipo-CAZ-Qui apresentou CIM de 0,062 µg/mL para *E. coli* ATCC 25922 e 0,125 µg/mL para *E. coli* NCTC 13846 e *E. coli* H10407, enquanto Lipo-AU-Qui exibiu CIM de 62,5 µg/mL para todas as cepas testadas. A CBM de Lipo-CAZ-Qui foi de 0,062 µg/mL para *E. coli* ATCC 25922, 0,250 µg/mL para *E. coli* NCTC 13846 e 0,125 µg/mL para *E. coli* H10407, enquanto Lipo-AU-Qui exibiu CIM de 62,5 µg/mL frente a todas as cepas testadas.

Tabela 6. Avaliação da atividade antibacteriana de CAZ, AU, Lipo-CAZ-Qui, Lipo-AU-Qui, LIPO-CAZ-AU-Qui e Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-Qui frente a *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* NCTC 13846 e *E. coli* H10407.

Bactérias	CAZ		AU		Lipo-CAZ-Qui		Lipo-AU-Qui		Lipo-CAZ-AU-Qui		Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-Qui	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
	µg/mL											
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1,95	1,95	500	1000	0,062	0,062	62,5	62,5	0,975/0,975	0,975/0,975	0,031/0,488	0,031/0,488
<i>E. coli</i> NCTC 13846	1,95	1,95	1000	1000	0,125	0,250	62,5	62,5	1,95/1,95	1,95/1,95	0,062/0,976	0,062/0,976
<i>E. coli</i> H10407	1,95	1,95	250	1000	0,125	0,125	62,5	62,5	0,975/0,975	0,975/0,975	0,062/0,975	0,062/0,975

CAZ: Ceftazidima; AU: Ácido úsnico; Lipo-CAZ-Qui: Lipossoma revestido com quitosana contendo ceftazidima; Lipo-AU-Qui: Lipossoma revestido com quitosana contendo ácido úsnico; LIPO-CAZ-AU-Qui: Lipossoma revestido com quitosana coencapsulando

ceftazidima e ácido único; Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-Qui: Amostra *pool*; CIM: Concentração inibitória mínima; CBM: Concentração bactericida mínima; ATCC: American Type Culture Collection; NCTC: National Collection of Type Cultures.

A atividade de CAZ encapsulada em lipossomas frente a cepas de bacilos Gram-negativos já foi previamente reportada na literatura, embora, até o presente momento não se tenham resultados publicados da mesma em lipossomas revestidos por quitosana. Torres *et al.* (2012) testaram lipossomas convencionais contendo CAZ (Lipo-CAZ) frente a *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *P. aeruginosa* SPM-1, obtendo CIM de 8 µg/mL e 1024 µg/mL para a CAZ, enquanto Lipo-CAZ apresentou valores de 4 µg/mL e 512 µg/mL, respectivamente. A CBM também apresentou redução de 32 µg/mL para 16 µg/mL quando a CAZ foi encapsulada. Farzampanah *et al.* (2017) também avaliaram a eficácia dessas formulações frente a *P. aeruginosa* ATCC 27853, cujos resultados indicaram inibição bacteriana em 2 µg/mL para a CAZ e 0,5 µg/mL para Lipo-CAZ.

Quanto ao AU, são escassos os estudos que tenham explorado o seu potencial inibitório frente a bactérias Gram-negativas. Dorszynska *et al.* (2014) testaram o AU frente a *E. coli* MG1655, cepa resistente à polimixina, cujos resultados indicaram que não houve inibição em nenhuma das concentrações testadas (CIM de 0,5 a 5000 µg/mL). Costa-Júnior *et al.* (2020) testaram AU frente a isolados de *P. aeruginosa* PA 05, PA 07, PA 18, PA 19, PA 46, PA 56, PA 57, PA 78, e PA 82, obtendo CIMs que variaram de 250 a 500 µg/mL.

A baixa atividade do AU frente a essas bactérias pode estar relacionada com a baixa permeabilidade das membranas bacterianas a agentes lipofílicos, como o AU, dificultando assim a sua permeação e capacidade de inibir o crescimento bacteriano. Levando em consideração esse fator, os nanocarreadores representam alternativas viáveis, visto que auxiliam no processo de adesão e liberação da substância encapsulada no seu interior da célula bacteriana (LUZINA; SALAKHUTDINOV, 2016; ACOSTA-GUTIÉRREZ *et al.*, 2021).

Na literatura foram encontrados alguns estudos que avaliaram a atividade de AU nanoencapsulado frente a bactérias Gram-negativas. Grumezescu *et al.* (2013) desenvolveram nanopartículas à base de óxido de ferro (Fe₃O₄) contendo AU e testaram frente a *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853, observando CIM e CBM de 10 e 60 µg/mL, respectivamente. Khan, Yu e Kim (2020) utilizaram nanopartículas de quitosana para encapsulação do AU e demonstraram CIMs de 1024 µg/mL e 512 µg/mL frente a *E. coli* KCTC 1682 e *P. aeruginosa* KCTC 1637, respectivamente.

Ademais, nossos resultados estão de acordo com o descrito na literatura, os quais demonstram a redução significativa de CIM e CBM para antibióticos encapsulados em lipossomas em comparação com os fármacos livres. Além disso, a utilização do revestimento dos lipossomas com quitosana é uma estratégia que promove aumento da atividade antibacteriana, pois a quitosana em sinergia com o fármaco encapsulado, interagem com a carga negativa presente nos grupos carboxilas da parede celular bacteriana, bloqueando o transporte de substâncias essenciais para a sobrevivência da bactéria, e, em paralelo facilita a internalização do fármaco no interior da bactéria, resultando em morte bacteriana (PU; TANG, 2016; ALSHAMSAN *et al.*, 2019).

Uma vez que a utilização de terapia combinada representa uma alternativa no tratamento de doenças bacterianas e pode ser empregada com o propósito de aumentar a potência e, por consequência, o sucesso terapêutico. Assim, é importante explorar o potencial de sinergia dos medicamentos e com isso reduzir a dose necessária para atingir o efeito desejado, levando também a possível redução dos efeitos colaterais (VASCONCELOS *et al.*, 2020). Nesse sentido, o presente trabalho propôs o desenvolvimento de duas estratégias baseadas nesse princípio: a coencapsulação de CAZ e AU em uma mesma formulação (Lipo-CAZ-AU-Qui) e a mistura das duas formulações contendo os fármacos encapsulados isoladamente, chamado de *pool* (Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-Qui).

Lipo-CAZ-AU-Qui exibiu valores de CIM e CBM de 0,975 µg/mL para *E. coli* ATCC 25922 e *E. coli* H10407, enquanto para *E. coli* NCTC 13846, CIM e CBM foram de 1,95 µg/mL. O *pool*, por sua vez, teve CIM e CBM determinada em 0,031+0,488 µg/mL para *E. coli* ATCC 25922 e 0,062+ 0,976 µg/mL para *E. coli* NCTC 13846 e *E. coli* H10407. Esses dados indicam que o *pool* apresentou maior potencial antibacteriano comparado a todas as formulações desenvolvidas.

A coencapsulação de fármacos, apesar de ser considerada vantajosa por fatores relacionados à preservação da viabilidade dos fármacos durante o trânsito gastrointestinal, melhor armazenamento e transporte, dado a existência de apenas uma formulação e evitar o acúmulo de fármaco no local de ação, tem desvantagens significativas como a agregação indesejada dos fármacos, que pode acarretar em redução da eficiência de carreamento dos fármacos e eficiência de encapsulação,

além do desafio do perfil de liberação sincronizada ou controlada (SUN *et al.*, 2017; MENG *et al.*, 2021).

Alguns estudos da literatura corroboram os achados do presente estudo ao observar que a formulação coencapsulando os fármacos apresentam menor potencial antibacteriano *in vitro* comparado às formulações encapsulando os fármacos isoladamente. Aljihani *et al.* (2020) coencapsularam azitromicina e N-acetilcisteína em lipossomas convencionais e avaliaram sua atividade antibacteriana frente a isolados clínicos de *E. coli*, SA057, onde a CIM para o lipossoma contendo azitromicina (LA) foi de 0,38 µg/mL e CBM de 0,75 µg/mL, enquanto os lipossomas contendo N-acetilcisteína (LN) não apresentaram atividade frente a cepa testada. Com a coencapsulação de ambos os fármacos (LAN), os valores foram de 0,62 µg/mL para CIM e 1,25 µg/mL para CBM.

Esses resultados corroboram com os achados por Alarfaj *et al.* (2022) que também verificaram essa diferença. O estudo avaliou a eficácia da encapsulação em lipossomas da tobramicina (TL), e tobramicina + N-acetilcisteína (TNL), frente a isolados clínicos de *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae*. As CIMs obtidas para o TL foram de 8-32 µg/mL e CBM de 16-64 µg/mL, enquanto TNL apresentou CIM variando de 16-32 µg/mL e 32-128 µg/mL, respectivamente. Assim, os autores indicam que apesar dos resultados sejam inferiores ao observado nos fármacos encapsulados de forma individual, a coencapsulação ainda é justificada em decorrência de outros fatores relacionados a formulação, como a estabilidade e redução da toxicidade, apesar de serem necessários estudos *in vivo* para que possam verificar aspectos como farmacocinética e farmacodinâmica a fim de confirmar qual formulação é mais adequada.

Quanto a utilização do *pool* das formulações lipossomais, alguns estudos indicam sua eficácia devido a capacidade de dois fármacos encapsulados isoladamente em dois nanocarreadores atingirem alvos diferentes de forma sincronizada (EFTEKHAR *et al.*, 2019; JAMIL *et al.*, 2019). Low, Martin e Kenward (2013) analisaram a eficácia antibacteriana da mistura de lipossomas contendo óleo de Tea tree (Lipo-TTO) e íons de prata (Lipo-Ag). Nesse estudo foi observado que a concentração letal mínima para *P. aeruginosa* foi de 0,25% para Lipo-TTO e $5,08 \times 10^{-3}\%$ para Lipo-Ag, enquanto o *pool* das formulações apresentou concentração letal de 0,05% + $1,59 \times 10^{-3}\%$, respectivamente, mostrando o potencial de melhora da

eficácia antimicrobiana através da mistura desses dois lipossomas. Nesse contexto, sugere-se que, uma vez que ambos estão encapsulados em nanossistemas individuais, estes não competem entre si por espaço na vesícula, e assim, pode ser induzido um efeito sinérgico com concentrações adequadas dos fármacos resultando em morte devido interrupção nos processos celulares essenciais (JAMIL *et al.*, 2019)

O tratamento preventivo com o uso de antibióticos contra bactérias relacionadas com o desenvolvimento de câncer, como o observado na *Helicobacter pylori* e o câncer gástrico, já é bastante reportado na literatura (LIOU *et al.*, 2019). Nesse contexto, estes medicamentos são, geralmente, utilizados após isolamento dos microrganismos em amostras de biópsia e tem por objetivo eliminar a colonização dos mesmos antes do desenvolvimento da neoplasia (SUZUKI; MORI, 2018). Portanto, a partir dos resultados encontrados nesse estudo, há a possibilidade de utilização das formulações encapsulando CAZ e AU isoladamente com a formulação coencapsulando os dois fármacos e, principalmente o *pool* das duas formulações em pacientes que foram diagnosticados com cepas genotóxicas de *Escherichia coli* na tentativa de prevenir o desenvolvimento de CCR.

5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME

Sabendo-se que a formação de biofilme confere um ambiente propício para o desenvolvimento bacteriano e, com isso, causa resistência aos antibióticos, é necessário o desenvolvimento de alternativas que possam ser capazes de realizar a inibição e erradicação do mesmo. Estudos indicam que os lipossomas apresentam a capacidade de adsorção na superfície do biofilme bacteriano e, devido a isso, permitem a entrega dos fármacos encapsulados nas células bacterianas (HEIDARI *et al.*, 2020; LU *et al.*, 2021).

5.3.1 Avaliação da inibição do biofilme

A inibição da formação do biofilme por CAZ, AU, Lipo-CAZ-Qui, Lipo-AU-Qui e Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-Qui ocorreu de modo dependendo da dose, com maior inibição na CIM e menor inibição na CIM/16 (Figura 18). Assim, foi observada uma

inibição do biofilme entre 4,4 e 70,1% para CAZ, entre 2,5 e 66,5% para AU, entre 54,6 e 81,1% para Lipo-CAZ-Qui, entre 20,4 e 69,6% para Lipo-AU-Qui, entre 66,7 e 94,4% para Lipo-CAZ-AU-Qui, e entre 61,7 e 98,1% para Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-Qui. CAZ e AU encapsulados nos lipossomas revestidos com quitosana apresentaram valores de CIMB inferiores quando comparado com os fármacos livres com valores de inibição de superiores em até 13 vezes. Foi, ainda, possível observar o potencial de inibição da formação do biofilme das formulações coencapsulando CAZ e AU, além do *pool*, exibindo, em ambos os casos, potencial antibiofilme superior aos fármacos livres e encapsulados separadamente. Conforme esperado, Lipo-Qui não inibiu a formação de biofilme em nenhuma das concentrações testadas.

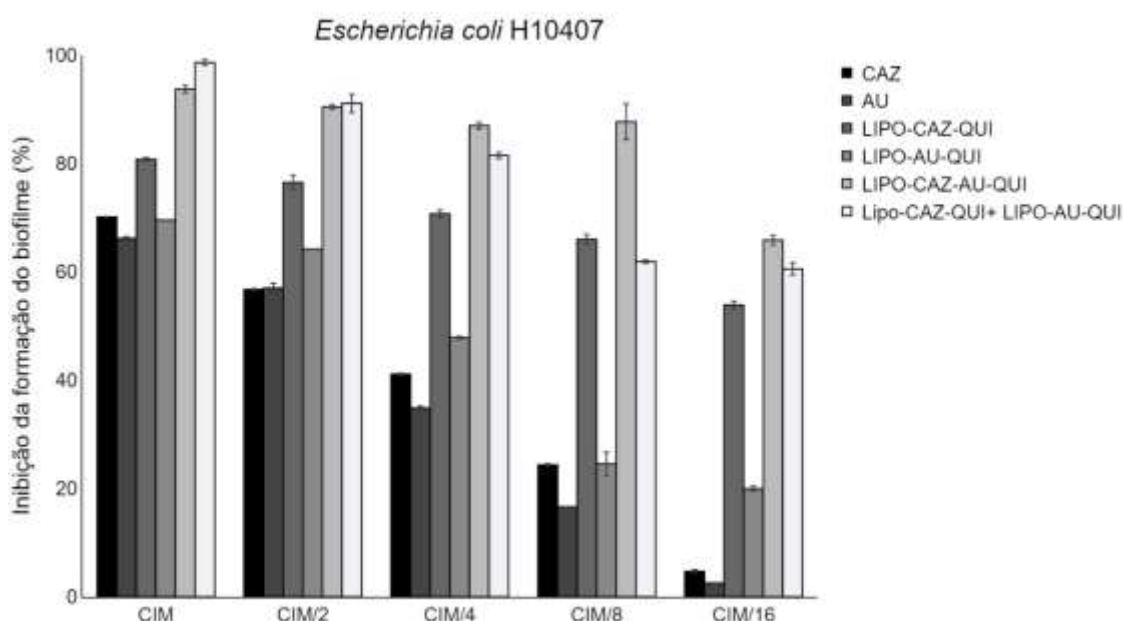


Figura 26. Inibição da formação do biofilme de cepas de *Escherichia coli* H100407 após o tratamento a ceftazidima e ácido úsnico encapsulados em lipossomas revestidos com quitosana.

CIM: Concentração inibitória mínima; CAZ: Ceftazidima; AU: Ácido úsnico; Lipo-CAZ-Qui: Lipossoma revestido com quitosana contendo ceftazidima; Lipo-AU-Qui: Lipossoma revestido com quitosana contendo ácido úsnico; LIPO-CAZ-AU-Qui: Lipossoma revestido com quitosana coencapsulando ceftazidima e ácido úsnico; Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-Qui: Amostra *pool*.

Os biofilmes são formados por uma matriz de exopolissacarídeo que isola as bactérias de substâncias antibacterianas. Nesse sentido, as substâncias eficazes para fins antibiofilme devem apresentar capacidade de penetrar no biofilme e eliminar bactérias (LU *et al.*, 2021). Baseado nisso, a atividade de inibição de biofilme exibidas pelas formulações desenvolvidas no presente estudo, ocorre pela ação de CAZ e AU encapsulados, uma vez que ambos apresentam potencial antibiofilme, especialmente ao que se refere às etapas de adesão, proliferação e crescimento de biofilmes (BATTISTA *et al.*, 2020; MALAEKEH-NIKOUEI *et al.*, 2020).

Assim, para que haja a inibição da formação de biofilmes, existem três estratégias, atingir de forma direta as células bacterianas, bloquear a adesão bacteriana a uma superfície, ou, interromper a comunicação entre as células – também chamado de *Quorum sensing*. Desse modo, fármacos que podem inibir qualquer uma dessas estratégias pode ser promissora como moléculas para serem encapsuladas em nanoformulações como propostas antibiofilmes, já que estas dificultam a manutenção da estrutura tridimensional do biofilme (ZHANG, 2018; ALAM *et al.*, 2020)

A fim de avaliar a inibição da formação de biofilme de nanossistemas alguns estudos foram desenvolvidos. Thyagarajan *et al.* (2015) avaliaram ceftazidima encapsula em nanopartículas revestidas com quitosana frente a *E. coli*, e obtiveram resultados de inibição de até 80% na concentração de 100 µg/mL, cujos autores indicam que a referida atividade foi mediada através da redução da quantidade de carboidratos totais e proteínas na matriz que envolve os biofilmes, fator este que leva enfraquecimento da estrutura do biofilme, e, assim, facilitou a entrada da CAZ.

Apesar de não se terem achados na literatura com avaliação do AU encapsulado em nanossistemas para fins antibiofilmes de bactérias Gram-negativas, este já foi previamente reportado em Gram-positivas. Francolini *et al.* (2019) investigaram o potencial antibiofilme de lipossomas glicosilados contendo AU frente a biofilmes de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, com CIMB de 16 µg/mL. Para os autores, a presença da carga positiva e os resíduos de açúcares presentes na superfície lipossomal são fundamentais para promoção da interação dos lipossomas com microrganismos.

Além das características dos fármacos, as relacionadas aos lipossomas podem melhorar o potencial antibiofilme. A literatura relata que lipossomas devem ter diâmetros entre 100 e 300 nm para melhorar a penetração e direcionamento dos agentes antibacterianos no biofilme (KHAN *et al.*, 2020). Assim, os lipossomas desenvolvidos nesse estudo apresentaram tamanhos apropriados para essa penetração (116 a 240 nm). Além disso, a presença da quitosana como revestimento confere uma carga superficial positiva às formulações de Lipo-CAZ-Qui, Lipo-AU-Qui, Lipo-CAZ-AU-QUI e Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-Qui, fator este que possibilita a interação eletrostática com a superfície das bactérias carregada negativamente, podendo reduzir a adesão bacteriana aos enterócitos, resultando no impedimento da formação do biofilme (MALAEKEH-NIKOUEI *et al.*, 2020).

5.3.2 Avaliação da inibição do biofilme pré-formado

A inibição do biofilme pré-formado após exposição a CAZ, AU, Lipo-CAZ-Qui, Lipo-AU-Qui e Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-Qui também ocorreu de forma dose dependente, com maior percentual de inibição em $16\times$ CIM. Dessa forma, foram observados percentuais entre 13,1 e 46,7% para CAZ, 6,5 e 27,8% para AU, 26,4 e 82,5% para Lipo-CAZ-Qui, 13,5 e 50,4% para Lipo-AU-Qui, 42,2 e 81,1% para Lipo-CAZ-AU-Qui, e 50,6 e 89,2% para Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-Qui (Figura 19).

. Portanto, nota-se que a CAZ e AU encapsulado em lipossomas apresentaram valores de inibição maiores quando comparados aos fármacos livres, e, ademais, a associação desses fármacos tanto na forma de coencapsulação, quanto de *pool*, potencializou ainda mais esses valores. Conforme esperado, Lipo-Qui não erradicou a formação de biofilme em nenhuma das concentrações testadas.

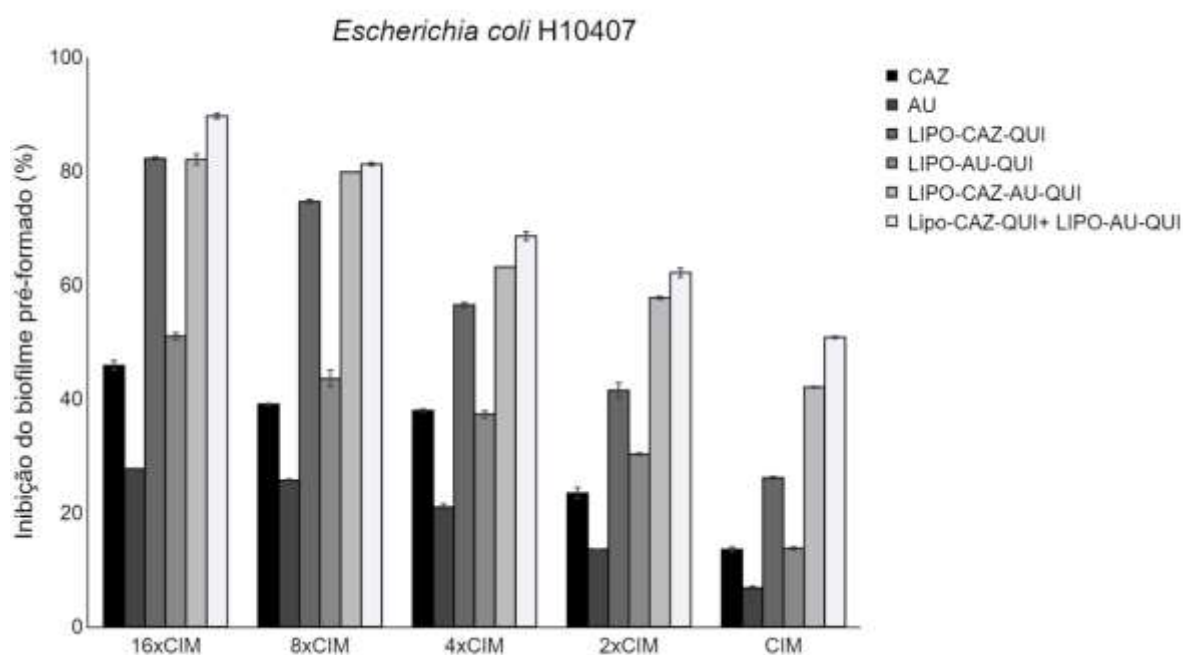


Figura 27. Inibição do biofilme pré-formado por cepas de *Escherichia coli* H100407 após o tratamento com ceftazidima e ácido úsnico encapsulados em lipossomas revestidos com quitosana.

CIM: Concentração inibitória mínima; CAZ: ceftazidima; AU: Ácido úsnico; Lipo-CAZ-Qui: Lipossoma revestido com quitosana contendo ceftazidima; Lipo-AU-Qui: Lipossoma revestido com quitosana contendo ácido úsnico; LIPO-CAZ-AU-Qui: Lipossoma revestido com quitosana coencapsulando ceftazidima e ácido úsnico; Lipo-CAZ-Qui + Lipo-AU-Qui: Amostra *Pool*.

A inibição do biofilme pré-formado consiste no combate direto aos biofilmes já estabelecidos, através de mecanismos que degradam a matriz de exopolissacarídeo. Nesse contexto, além da eliminação das células bacterianas no biofilme, a matriz deve ser erradicada a fim de que novos biofilmes não possam ser formados (DÍEZ-AGUILAR *et al.*, 2021). Em consonância com os nossos resultados, Wan *et al.* (2020) desenvolveram uma nanopartícula de prata conjugada com alginato e ceftazidima (Ag@MON-CE) e avaliaram a inibição do biofilme formado de *P. aeruginosa* PA 01, que variou entre 25 e 26% para a CAZ livre e 70 e 73,71% para a Ag@MON-CE nas concentrações de 0,07 a 1,72 mg/mL. Segundo os autores, isso se explica devido à sinergia entre os íons de prata, ceftazidima e o alginato, os quais degradaram os componentes da matriz ocasionando inibição do biofilme.

Portanto, os nossos resultados indicam que os lipossomas revestidos por quitosana encapsulando a CAZ e o AU, podem não apenas inibir a formação do biofilme de *E. coli* H10407, mas também inibir eficientemente o biofilme formado, fornecendo, assim, base para ensaios *in vivo* que possam demonstrar o desempenho da formulação.

6 CONCLUSÃO

Os lipossomas revestidos com quitosana encapsulando a ceftazidima e o ácido úsnico desenvolvidos nesse estudo foram produzidos através da aplicação de técnica simples, com baixo custo e passível de escalonamento industrial. Ademais, estes apresentaram características compatíveis com a potencial administração oral em futuras aplicações na terapia antibacteriana e antibiofilme *in vitro* e *in vivo*, tais como tamanho de partícula abaixo de 245 nm, carga superficial positiva, alta eficiência de encapsulação dos fármacos e estabilidade em dispersão por 3 meses, térmica, e em meio gástrico e intestinal pH simulados.

A CAZ e o AU encapsulados isoladamente ou co-encapsulados nos lipossomas apresentaram atividade antibacteriana *in vitro* frente aos isolados de *Escherichia coli*, além de apresentar potencialização da inibição da formação do biofilme e no biofilme formado. Portanto, os lipossomas desenvolvidos nesse estudo se configuram como uma estratégia terapêutica promissora frente às bactérias indutoras de CCR. Assim, espera-se que os resultados futuros possam confirmar a possibilidade de administração por via oral em pacientes que apresentaram biópsias positivas para a presença de *E. coli* pks+, fornecendo, assim, uma nova inovação terapêutica no tratamento do CCR. Contudo, estudos de farmacocinética e farmacodinâmica devem ser realizados em estudos posteriores, a fim de comprovar o desempenho de cada formulação e a eficácia do sistema *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ABUHELWA, A. Y. *et al.* A quantitative review and metamodels of the variability and factors affecting oral drug absorption-part I: gastrointestinal pH. **AAPS Journal**, v. 18, n. 1, p. 1309–1321, 2016.
- ABUHELWA, A. Y. *et al.* Food, gastrointestinal pH, and models of oral drug absorption. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 112, n. 1, p. 234–248, 2017.
- ACOSTA-GUTIÉRREZ, S. *et al.* The Influence of Permeability through Bacterial Porins in Whole-Cell Compound Accumulation. **Antibiotics**, v. 10, n. 6, p. 635-642, 2021.
- AGHDAM, M. A. *et al.* Recent advances on thermosensitive and pH-sensitive liposomes employed in controlled release. **Journal of Controlled Release**, v. 315, p. 1-22, 2019.
- AHMED, K. S. *et al.* Liposome: Composition, characterisation, preparation, and recent innovation in clinical applications. **Journal of drug targeting**, v. 27, n. 7, p. 742-761, 2019.
- AJEESHKUMAR, K. K. *et al.* Advancements in liposome technology: Preparation techniques and applications in food, functional foods, and bioactive delivery: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, n. 2, p. 1280-1306, 2021.
- ALARFAJ, R. E. *et al.* Antibacterial Efficacy of Liposomal Formulations Containing Tobramycin and N-Acetylcysteine against Tobramycin-Resistant *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Acinetobacter baumannii*. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 1, e. 130, 2022.
- ALAVI, S.; HAERI, A.; DADASHZADEH, S. Utilization of chitosan-caged liposomes to push the boundaries of therapeutic delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 991-1012, 2017.
- ALHINAI, E. A.; GEMMA, E. W.; DANIEL, M. C. The role of the gut microbiota in colorectal cancer causation. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 21, p. 1-12, 2019.
- ALJIHANI, S. A. *et al.* Enhancing azithromycin antibacterial activity by encapsulation in liposomes/liposomal-N-acetylcysteine formulations against resistant clinical strains of *Escherichia coli*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 27, n. 11, p. 3065-3071, 2020.
- ALOMRANI, A. *et al.* The use of chitosan-coated flexible liposomes as a remarkable carrier to enhance the antitumor efficacy of 5-fluorouracil against colorectal cancer. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 27, n. 5, p. 603-611, 2019.
- ALSHAMSAN, A. *et al.* Exploring anti-MRSA activity of chitosan-coated liposomal dicloxacillin. **Journal of Microbiological Methods**, v. 1, n. 156, p. 23-28, 2019.

- ANTONENKO, Y. 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.
- ARSÈNE, M. *et al.* Comparison of ceftazidime degradation in glass bottles and plastic bags under various conditions. **Journal of clinical pharmacy and therapeutics**, v. 27, n. 3, p. 205-209, 2002.
- ASHKTORAB, H. *et al.* A meta-analysis of MSI frequency and race in colorectal cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 23, e-34546, 2016.
- ASLAM, B. *et al.* Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. **Infection and drug resistance**, v. 11, e-1645, 2018.
- AZEVEDO, E. G. *et al.* Mixed formulation of conventional and pegylated liposomes as a novel drug delivery strategy for improved treatment of visceral leishmaniasis. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 11, n. 10, p. 1551-1560, 2014.
- BABAEI, H. *et al.* The Effect of Titanium Dioxide Nanoparticles Synthesized by *Bacillus tequilensis* on *clb* Gene Expression of Colorectal Cancer-causing *Escherichia coli*. **Archives of Pharmacy Practice**, v. 11, n. 1, p. 22-31, 2020.
- BAEDER, D. Y. *et al.* Antimicrobial combinations: Bliss independence and Loewe additivity derived from mechanistic multi-hit models. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 371, n. 1695, p. 20150294, 2016.
- BANGALORE, P. K. *et al.* Usnic acid enaminone-coupled 1, 2, 3-triazoles as antibacterial and antitubercular agents. **Journal of natural products**, v. 83, n. 1, p. 26-35, 2020.
- BASHIRI, S. *et al.* Preparation and characterization of chitosan-coated nanostructured lipid carriers (CH-NLC) containing cinnamon essential oil for enriching milk and anti-oxidant activity. **LWT**, v. 119, n. 1, p 108836, 2020.
- BATTISTA, S. *et al.* Correlation of Physicochemical and Antimicrobial Properties of Liposomes Loaded with (+)-Usnic Acid. **ChemPlusChem**, v. 85, n. 5, p. 1014-1021, 2020.
- BATTISTA, S. *et al.* Use of N-oxide and cationic surfactants to enhance antioxidant properties of (+)-usnic acid loaded liposomes. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 585, e. 124154, 2020.
- BEKKER, O. B. *et al.* Synthesis and activity of (+)-usnic acid and (–)-usnic acid derivatives containing 1, 3-thiazole cycle against *Mycobacterium tuberculosis*. **Medicinal Chemistry Research**, v. 24, n. 7, p. 2926-2938, 2015.
- BOSSUET-GREIF, N. *et al.* The colibactin genotoxin generates DNA interstrand cross-links in infected cells. **MBio**, v. 9, n. 2, p. 2393-2417, 2018.
- BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 1, p. 394–424, 2018.
- BRAY, F.; STEWART, B. W.; WILD, C. P. **World cancer report 2014**. In: Transitions in human development and the global cancer burden (p. 54-68). International Agency for Research on Cancer, WHO, Geneva, 2014.

- BUC, E. *et al.* High prevalence of mucosa-associated *E. coli* producing cyclomodulin and genotoxin in colon cancer. **PloS one**, v. 8, n. 2, e56964, 2013.
- BULLMAN, S. *et al.* Analysis of *Fusobacterium* persistence and antibiotic response in colorectal cancer. **Science**, v. 358, n. 6369, p. 1443-1448, 2017.
- BÜRTIN, F.; MULLINS, C. S.; LINNEBACHER, M. Mouse models of colorectal cancer: Past, present and future perspectives. **World journal of gastroenterology**, v. 26, n. 13, p. 1394, 2020.
- BUTT, J. *et al.* Association of pre-diagnostic antibody responses to *Escherichia coli* and *Bacteroides fragilis* toxin proteins with colorectal cancer in a European cohort. **Gut microbes**, v. 13, n. 1, p. 1-14, 2021.
- CADDEO, C. *et al.* Cross-linked chitosan/liposome hybrid system for the intestinal delivery of quercetin. **Journal of colloid and interface science**, v. 461, p. 69-78, 2016.
- CAMPOS, T. A. **Complexo de inclusão ácido fumarprotocetrário: 2-hidroxiopropil-B-ciclodextrina; preparação, caracterização e encapsulação em lipossomas**. 2012. 83p. Dissertação (Mestrado em saúde humana e meio ambiente) - Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Vitória de Santo Antão, 2012.
- CAVALCANTI, I. D. L.; NOGUEIRA, M. C. D. B. L. Pharmaceutical nanotechnology: which products are been designed against COVID-19?. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 22, n. 9, p. 1-11, 2020.
- CAVALCANTI, I. M. F. *et al.* The encapsulation of β -lapachone in 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex into liposomes: a physicochemical evaluation and molecular modeling approach. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 3, p. 332-340, 2011.
- CAVESTRO, G. M. *et al.* Early onset sporadic colorectal cancer: Worrisome trends and oncogenic features. **Digestive and liver disease**, v. 50, n. 6, p. 521-532, 2018.
- CHEN, B. *et al.* PIN21 Cost-Effectiveness of Ceftazidime-Avibactam for Gram-Negative Infections with Limited Treatment Options in China. **Value in Health Regional Issues**, v. 22, S52, 2020.
- CHEN, D. *et al.* Comparative study of Pluronic® F127-modified liposomes and chitosan-modified liposomes for mucus penetration and oral absorption of cyclosporine A in rats. **International journal of pharmaceutics**, v. 449, n. 1-2, p. 1-9, 2013.
- CHEN, H. D. *et al.* The potential use of novel chitosan-coated deformable liposomes in an ocular drug delivery system. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v. 143, n. 1, p. 455-462, 2016.
- CHOI, J. J.; MCCARTHY, M. W. Cefiderocol: a novel siderophore cephalosporin. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 27, n. 2, p. 193-197, 2018.
- CHU, J. N. *et al.* Cost-effectiveness of immune checkpoint inhibitors for microsatellite instability high/mismatch repair-deficient metastatic colorectal cancer. **Cancer**, v. 125, n. 2, p. 278-289, 2019.

CIMMINO, A. *et al.* Have lichenized fungi delivered promising anticancer small molecules?. **Phytochemistry Reviews**, v. 18, n. 1, p. 1-36, 2019.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 27th Edition (M100-S27). Wayne, PA, 2019.

COLINO, C. I. *et al.* A comparative study of liposomes and chitosomes for topical quercetin antioxidant therapy. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 103094, 2022.

CONDON, R. E. *et al.* Efficacy of oral and systemic antibiotic prophylaxis in colorectal operations. **Archives of surgery**, v. 118, n. 4, p. 496-502, 1983.

COSTA JÚNIOR, S. D. *et al.* Synergistic effect between usnic acid and polymyxin B against resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2020, e-9852145, 2020.

DAFALE, N. A. *et al.* Quantification of ceftriaxone sodium in pharmaceutical preparations by a new validated microbiological bioassay. **Analytical Methods**, v. 4, n. 8, p. 2490-2498.

DAGOGLU, N. *et al.* Stereotactic body radiotherapy (SBRT) reirradiation for pelvic recurrence from colorectal cancer. **Journal of surgical oncology**, v. 111, n. 1, p. 478-482, 2015.

DAIKOS, G. L. *et al.* Review of ceftazidime-avibactam for the treatment of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. **Antibiotics**, v. 10, n. 9, p. 1126, 2021.

DAS, P.; YANG, X.; MA, L. Z. Analysis of biosurfactants from industrially viable *Pseudomonas* strain isolated from crude oil suggests how rhamnolipids congeners affect emulsification property and antimicrobial activity. **Frontiers in Microbiology, Lausanne**, v. 5, n. 696, p. 1-8, 2014

DEGELING, K. *et al.* Health economic models for metastatic colorectal cancer: a methodological review. **PharmacoEconomics**, v. 38, n. 7, p. 683-713, 2020.

DEJEA, C. M. *et al.* Patients with familial adenomatous polyposis harbor colonic biofilms containing tumorigenic bacteria. **Science**, v. 359, n. 6375, p. 592-597, 2017.

DEKKER, E. *et al.* Colorectal cancer. **Lancet**, v. 394, n. 1, p. 1467-1480, 2019.

DENG, S. *et al.* Polymeric nanocapsules as nanotechnological alternative for drug delivery system: current status, challenges and opportunities. **Nanomaterials**, v. 10, n. 5, p. 847-855, 2020.

DICASTILLO, C. L. *et al.* Novel hollow titanium dioxide nanospheres with antimicrobial activity against resistant bacteria. **Beilstein journal of nanotechnology**, v. 10, n. 1, p. 1716-1725, 2019.

DÍEZ-AGUILAR, M. *et al.* Anti-biofilm activity of murepavadin against cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 76, n. 10, p. 2578-2585, 2021.

DMOUR, I.; TAHA, M. O. Natural and semisynthetic polymers in pharmaceutical nanotechnology. **Organic Materials as Smart Nanocarriers for Drug Delivery**, v. 12, p. 35-100, 2018.

DONG, W. *et al.* Preparation and characterization of egg yolk immunoglobulin loaded chitosan-liposome assisted by supercritical carbon dioxide. **Food Chemistry**, v. 369, e-130934, 2018.

DOWLATH, M. J. *et al.* Effects of radiation and role of plants in radioprotection: A critical review. **Science of The Total Environment**, v. 779, p. 1-18, 2021.

DREWES, J. L., *et al.* High-resolution bacterial 16S rRNA gene profile meta-analysis and biofilm status reveal common colorectal cancer consortia. **NPJ biofilms and microbiomes**, v. 3, n. 1, p. 1-12, 2017.

DRÖGE, L. H. *et al.* Reduced toxicity in the treatment of locally advanced rectal cancer: a comparison of volumetric modulated arc therapy and 3D conformal radiotherapy. **BMC cancer**, v. 15, n. 1, p. 1-8, 2015.

DU, C. *et al.* Oral fecal microbiota transplant capsules are safe and effective for recurrent *Clostridioides difficile* infection: a systematic review and meta-analysis. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 55, n. 4, p. 300-308, 2021.

DUDHIPALA, N. Influence of solid lipid nanoparticles on pharmaco-dynamic activity of poorly oral bioavailable drugs. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology**, v. 13, n. 4, p. 4979-4983, 2020.

DUDLEY, J. C. *et al.* Microsatellite instability as a biomarker for PD-1 blockade. **Clinical Cancer Research**, v. 22, n. 4, p. 813-820, 2016.

DURÃES, R. O. *et al.* Role of Genetic Ancestry in 1,002 Brazilian Colorectal Cancer Patients From Barretos Cancer Hospital. **Frontiers in Oncology**, v. 10, p. 145, 2020.

EFTEKHARI, R. B. *et al.* Co-delivery nanosystems for cancer treatment: a review. **Pharmaceutical nanotechnology**, v. 7, n. 2, p. 90-112, 2019.

ESPOSTO, B. S. *et al.* Liposomes vs. chitosomes: Encapsulating food bioactives. **Trends in Food Science & Technology**, v. 108, p. 40-48, 2021.

ESTRADA, A.; WRIGHT, D. L.; ANDERSON, A. C. Antibacterial antifolates: from development through resistance to the next generation. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 6, n. 8, e- 028324, 2016.

EZZAT, H. M. *et al.* Improved oral bioavailability of the anticancer drug catechin using chitosomes: design, *in-vitro* appraisal and *in-vivo* studies. **International journal of pharmaceutics**, v. 565, n. 1, p. 488-498, 2019.

FAROOQI, A. A. *et al.* **Overview of the oncogenic signaling pathways in colorectal cancer: Mechanistic insights**. In: Seminars in cancer biology, v. 58, p. 65-79. Academic Press, 2019.

FARZAMPANAH, L. *et al.* Preparation and Investigation of *In Vitro* Effect of Liposomal Ceftazidime on the Resistant *Pseudomonas Aeruginosa*. **Advanced Studies in Biology**, v. 9, n. 3, p. 105-111, 2017.

FAVORITI, P. *et al.* Worldwide burden of colorectal cancer: a review. **Updates in surgery**, v. 68, n. 1, p. 7-11, 2016.

- FERRAZ-CARVALHO, R. 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.
- FERREIRA, M. R. *et al.* Microbiota and radiation-induced bowel toxicity: lessons from inflammatory bowel disease for the radiation oncologist. **The Lancet Oncology**, v. 15, n. 3, p. 139-147, 2014.
- FERRO, A. *et al.* Acute kidney injury as the presenting complaint of ceftazidime-induced immune-mediated haemolysis. **BMJ Case Reports CP**, v. 12, n. 11, e232884, 2019.
- FEUSER, P. E. *et al.* Co-encapsulation of sodium diethyldithiocarbamate (DETC) and zinc phthalocyanine (ZnPc) in liposomes promotes increases phototoxic activity against (MDA-MB 231) human breast cancer cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 197, p. 111434, 2021.
- FONG, W. *et al.* Gut microbiota modulation: a novel strategy for prevention and treatment of colorectal cancer. **Oncogene**, v. 39, n. 26, p. 4925-4943, 2020.
- FOREMAN, K. J. *et al.* Forecasting life expectancy, years of life lost, and all-cause and causespecific mortality for 250 causes of death: reference and alternative scenarios for 2016-40 for 195 countries and territories. **Lancet**, v. 392, n. 10159, p. 2052-2090, 2018.
- FRANCOLINI, I. *et al.* Glucosylated liposomes as drug delivery systems of usnic acid to address bacterial infections. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 181, n. 1, p. 632-638, 2019.
- FU, Y. Y. *et al.* Synergistic antibacterial effect of ultrasound microbubbles combined with chitosan-modified polymyxin B-loaded liposomes on biofilm-producing *Acinetobacter baumannii*. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 1805, 2019.
- FUNDA, G. *et al.* Nanotechnology scaffolds for alveolar bone regeneration. **Materials**, v. 13, n. 1, p. 201, 2020.
- GALANTY, A.; PAŠKO, P.; PODOLAK, I. Enantioselective activity of usnic acid: A comprehensive review and future perspectives. **Phytochemistry Reviews**, v. 18, n. 2, p. 527-548, 2019.
- GAO, R., *et al.* Gut microbiota and colorectal cancer. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 36, n. 5, p. 757-769, 2017.
- GEBRIL, A. *et al.* Mucosal and systemic immune responses following mucosal immunisation of tetanus toxoid entrapped in lipid nanoparticles prepared by microwave reactor. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 2022.
- GELLER, L. T. *et al.* Potential role of intratumor bacteria in mediating tumor resistance to the chemotherapeutic drug gemcitabine. **Science**, v. 357, n. 6356, p. 1156-1160, 2017.

GIBIS, M.; RUEDT, C.; WEISS, J. *In vitro* release of grape-seed polyphenols encapsulated from uncoated and chitosan-coated liposomes. **Food Research International**, v. 88, p. 105-113, 2016.

GOMEZ, A. G.; HOSSEINIDOUST, Z. Liposomes for antibiotic encapsulation and delivery. **ACS infectious diseases**, v. 6, n. 5, p. 896-908, 2020.

GREGORIADIS, G. Liposomology: delivering the message. **Journal of liposome research**, v. 28, n. 1, p. 1-4, 2018.

GROTHEY, A. *et al.* Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. **Lancet**, v. 381, n. 1, p. 303-312, 2013.

GRUMEZESCU, A. M. *et al.* *In vitro* activity of the new water-dispersible Fe₃O₄@usnic acid nanostructure against planktonic and sessile bacterial cells. **Journal of nanoparticle research**, v. 15, n. 7, p. 1-10, 2013.

GUPTA, A. *et al.* Combatting antibiotic-resistant bacteria using nanomaterials. **Chemical Society Reviews**, v. 48, n. 2, p. 415-427, 2019.

GURPREET, K.; SINGH, S. K. Review of nanoemulsion formulation and characterization techniques. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 80, n. 5, p. 781-789, 2018.

HÄFNER, M. F.; DEBUS, J. Radiotherapy for colorectal cancer: current standards and future perspectives. **Visceral medicine**, v. 32, n. 3, p. 172-177, 2016.

HALL, A. B. *et al.* Human genetic variation and the gut microbiome in disease. **Nature Reviews Genetics**, v. 18, n. 11, p. 690-699, 2019.

HAMEDI, H. *et al.* Chitosan based bioadhesives for biomedical applications: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 119, p. 100, 2022.

HAMEDINASAB, H. *et al.* Development of chitosan-coated liposome for pulmonary delivery of N-acetylcysteine. **International journal of biological macromolecules**, v. 156, p. 1455-1463, 2020.

HAO, J. *et al.* Encapsulation of the flavonoid quercetin with chitosan-coated nano-liposomes. **LWT-Food Science and Technology**, v. 85, n. 1, p. 37-44, 2017.

HASAN, M. *et al.* Chitosan-coated liposomes encapsulating curcumin: Study of lipid-polysaccharide interactions and nanovesicle behavior. **RSC advances**, v. 6, n. 51, p. 45290-45304, 2017.

HASHIM, S. T. *et al.* Mechanism action and resistance style of antibiotics. **International Journal of Medical and Biomedical Studies**, v. 4, n. 2, p. 128-136, 2020.

HASSANZADEH, P.; ARBABI, E.; ROSTAMI, F. Development of a novel nanoformulation against the colorectal cancer. **Life Sciences**, v. 281, p. 119772, 2021.

HATTORI, N. *et al.* Antibiotics suppress colon tumorigenesis through inhibition of aberrant DNA methylation in an azoxymethane and dextran sulfate sodium colitis model. **Cancer science**, v. 110, n. 1, p. 147-156, 2019.

HE, H. *et al.* Adapting liposomes for oral drug delivery. **Acta pharmaceutica sinica B**, v. 9, n. 1, p. 36-48, 2019.

HELMINK, B. A. *et al.* The microbiome, cancer, and cancer therapy. **Nature medicine**, v. 25, n. 1, p. 377-388, 2019.

HERNANDEZ, C.; SHUKLA, S. Liposome based drug delivery as a potential treatment option for Alzheimer's disease. **Neural regeneration research**, v. 17, n. 6, p. 1190, 2022.

HOSOYA, N.; MIYAGAWA, K. Targeting DNA damage response in cancer therapy. **Cancer science**, v. 105, n. 4, p. 370-388, 2014.

HUANG, J. *et al.* Liposome-chitosan hydrogel bead delivery system for the encapsulation of linseed oil and quercetin: Preparation and *in vitro* characterization studies. **Lwt**, v. 117, p. 108615, 2020.

HUANG, M. *et al.* Liposome co-encapsulation as a strategy for the delivery of curcumin and resveratrol. **Food & function**, v. 10, n. 10, p. 6447-6458, 2019.

HUI, C.; HUANG, H. A study on chitosan-coated liposomes as a carrier of bovine serum albumin as oral protein drug. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 42, n. 10, p. 1494-1503, 2021.

HURWITZ, H. *et al.* Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. **The new england journal of medicine**, v. 350, n. 1, p. 2335-2342, 2004.

IMAI, H. *et al.* Antibiotics Improve the Treatment Efficacy of Oxaliplatin-Based but Not Irinotecan-Based Therapy in Advanced Colorectal Cancer Patients. **Journal of oncology**, v. 2020, n. 1701326, p. 1-8, 2020.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2019.

ITO, K. *et al.* Stereotactic body radiotherapy for bone metastases in patients with colorectal cancer. **Japanese journal of clinical oncology**, v. 50, n. 12 p. 1442-1446, 2020.

IVESON, T. J. *et al.* 3 versus 6 months of adjuvant oxaliplatin-fluoropyrimidine combination therapy for colorectal cancer (SCOT): an international, randomised, phase 3, non-inferiority trial. **The Lancet Oncology**, v. 19, n. 4, p. 562-578, 2018.

IYADORAI, T. *et al.* Prevalence and association of pks+ *Escherichia coli* with colorectal cancer in patients at the University Malaya Medical Centre, Malaysia. **PloS one**, v. 15, n. 1, e0228217, 2020.

JAMPILEK, J.; KOS, J.; KRALOVA, K. Potential of nanomaterial applications in dietary supplements and foods for special medical purposes. **Nanomaterials**, v. 9, n. 2, p. 296, 2019.

JANES, M. R. *et al.* Targeting KRAS mutant cancers with a covalent G12C-specific inhibitor. **Cell**, v. 172, n. 3, p. 578-589, 2018.

JANI, R. K.; GOHIL, K. M.; KAUSHALKUMAR JANI, R. Liposomal formulations in cancer therapy: Basic concepts to advanced strategies. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, v. 10, p. 386-393, 2018.

JASPERSON, K. W. *et al.* Hereditary and familial colon cancer. **Gastroenterology**, v. 138, p. 2044-2058, 2010.

JIAO, Z. *et al.* Preparation and evaluation of a chitosan-coated antioxidant liposome containing vitamin C and folic acid. **Journal of microencapsulation**, vol. 35, n. 3, p. 272-280, 2018.

JIN, Y. *et al.* Hemolytic *E. coli* promotes colonic tumorigenesis in females. **Cancer research**, v. 76, n. 10, p. 2891-2900, 2016.

JINGU, K. *et al.* Stereotactic radiotherapy for pulmonary oligometastases from colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. **Technology in cancer research & treatment**, v. 17, n. 1, p. 1-7, 2018.

JONES, T. E. *et al.* Ceftazidime stability and pyridine toxicity during continuous iv infusion. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 76, n. 4, p. 200-205, 2019.

JULIE, V. *et al.* Gut Microbiota as Potential Biomarker and/or Therapeutic Target to Improve the Management of Cancer: Focus on Colibactin-Producing *Escherichia coli* in Colorectal Cancer. **Cancers**, v. 13, n. 9, p. 2215-2225, 2021.

KAFATOS, G. *et al.* RAS mutation prevalence among patients with metastatic colorectal cancer: a meta-analysis of real-world data. **Biomarkers in medicine**, v. 11, n. 9, p. 751-760, 2017.

KARAIKOS, I. *et al.* Ceftazidime/avibactam in the era of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: experience from a national registry study. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 76, n. 3, p. 775-783, 2021.

KAŹMIERCZAK-SIEDLECKA, K. *et al.* Therapeutic methods of gut microbiota modification in colorectal cancer management—fecal microbiota transplantation, prebiotics, probiotics, and synbiotics. **Gut Microbes**, v. 11, n. 6, p. 1518-1530, 2020.

KESHARWANI, S. S. *et al.* Multifunctional approaches utilizing polymeric micelles to circumvent multidrug resistant tumors. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 173, p. 581-590, 2019.

KHAN, F. *et al.* Chitosan and their derivatives: Antibiofilm drugs against pathogenic bacteria. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 185, p. 110627, 2020.

KHAN, F.; YU, H.; KIM, Y. M. Bactericidal activity of usnic acid-chitosan nanoparticles against persister cells of biofilm-forming pathogenic bacteria. **Marine Drugs**, v. 18, n. 5, p. 270-281, 2020.

KHAN, I.; SAEED, K.; KHAN, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. **Arabian journal of chemistry**, v. 12, n. 7, p. 908-931, 2019.

KHURANA, R. K. *et al.* The sojourn from parenteral to oral taxanes using nanocarrier systems: A patent review. **Recent patents on drug delivery & formulation**, v. 10, n. 1, p. 44-58, 2016.

KIM, J. H. *et al.* Preparation, characterization, and pharmacokinetics of liposomal docetaxel for oral administration. **Archives of pharmacal research**, v. 41, n. 7, p. 765-775, 2018.

KIRAN, R. P. *et al.* Combined preoperative mechanical bowel preparation with oral antibiotics significantly reduces surgical site infection, anastomotic leak, and ileus after colorectal surgery. **Annals of surgery**, v. 262, n. 3, p. 416-425, 2015.

KOKAZ, S. F. *et al.* Dendrimers: Properties and Applications in Biomedical Field. **Nanoengineering of Biomaterials: Biomedical Applications**, v. 2, p. 215-243, 2022.

KÓSA, N. *et al.* Comparison of the efficacy of two novel antitubercular agents in free and liposome-encapsulated formulations. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 5, p. 2457, 2021.

KULU, Y. *et al.* Comparative outcomes of neoadjuvant treatment prior to total mesorectal excision and total mesorectal excision alone in selected stage II/III low and mid rectal cancer. **Annals of surgical oncology**, v. 23, n. 1, p. 106-113, 2016.

KUMAR, C. S. Nanotechnology tools in pharmaceutical R&D. **Materials Today**, v. 12, p. 24-30, 2010.

KWONG, S. P.; WANG, C. Usnic acid-induced hepatotoxicity and cell death. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 103493, p. 1-8, 2020.

LAGE, T. C. *et al.* *In vitro* inhibition of *Helicobacter pylori* and interaction studies of lichen natural products with jack bean urease. **New Journal of Chemistry**, v. 42, n. 7, p. 5356-5366, 2018.

LAXMINARAYAN, R. *et al.* Antibiotic resistance—the need for global solutions. **The Lancet infectious diseases**, v. 13, n. 12, p. 1057-1098, 2013.

LEE, Y. T.; TAN, Y. J.; OON, C. E. Molecular targeted therapy: treating cancer with specificity. **European journal of pharmacology**, v. 834, n. 1, p. 188-196, 2018.

LENZ, H. J. J. *et al.* Durable clinical benefit with nivolumab (NIVO) plus low-dose ipilimumab (IPI) as first-line therapy in microsatellite instability-high/mismatch repair deficient (MSI-H/dMMR) metastatic colorectal cancer (mCRC). **Annals of oncology**, v. 29, n. 8, p. 1-1, 2018.

LI, Y. *et al.* Corrigendum to 'Ion-paired pirenzepine-loaded micelles as an ophthalmic delivery system for the treatment of myopia'[Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine 13 (2017) 2079-2089/NANO1575]. **Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine**, v. 35, p. 102312, 2021.

LIMA, F. F. *et al.* Prolonged anesthesia and decreased toxicity of enantiomeric-excess bupivacaine loaded in ionic gradient liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 606, e-120944, 2021.

LIOU, J. M. *et al.* Efficacy and long-term safety of *H. pylori* eradication for gastric cancer prevention. **Cancers**, v. 11, n. 5, p. 593, 2019.

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

LIRA, M. C. *et al.* Inclusion complex of usnic acid with β -cyclodextrin: characterization and nanoencapsulation into liposomes. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 64, n. 3, p. 215-224, 2009.

LIU, C.; LAI, H.; CHEN, T. Boosting natural killer cell-based cancer immunotherapy with selenocystine/transforming growth factor-beta inhibitor-encapsulated nanoemulsion. **ACS nano**, v. 14, n. 9, p. 11067-11082, 2020.

LIU, W. *et al.* Environmental stress stability of microencapsules based on liposomes decorated with chitosan and sodium alginate. **Food chemistry**, v. 196, p. 396-404, 2016.

LIU, Y. *et al.* Eradication of Multidrug-Resistant Staphylococcal Infections by Light-Activatable Micellar Nanocarriers in a Murine Model. **Advanced Functional Materials**, v. 27, n. 44, p. 1701974, 2017.

LIU, Y. *et al.* Mucus adhesion-and penetration-enhanced liposomes for paclitaxel oral delivery. **International journal of pharmaceutics**, v. 537, n. 1-2, p. 245-256, 2018.

LOPÊS, A. *et al.* Colibactin-positive *Escherichia coli* induce a procarcinogenic immune environment leading to immunotherapy resistance in colorectal cancer. **International journal of cancer**, v. 146, n. 11, p. 3147-3159, 2020.

LOW, W. L. *et al.* Antimicrobial efficacy of liposome-encapsulated silver ions and tea tree oil against *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. **Letters in applied microbiology**, v. 57, n. 1, p. 33-39, 2013.

LU, C. *et al.* Antibiofilm activities of the cinnamon extract against *Vibrio parahaemolyticus* and *Escherichia coli*. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 1, p. 125-135, 2021.

LUCAS, C. *et al.* Autophagy of Intestinal Epithelial Cells Inhibits Colorectal Carcinogenesis Induced by Colibactin-producing *Escherichia coli* in ApcMin/+ mice. **Gastroenterology**, 2020.

LUO, Y. *et al.* Preparation and characterization of zein/chitosan complex for encapsulation of α -tocopherol, and its *in vitro* controlled release study. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 85, n. 2, p. 145-152, 2011.

LUZINA, O. A.; SALAKHUTDINOV, N. F. Biological activity of usnic acid and its derivatives: Part 1. Activity against unicellular organisms. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 42, n. 2, p. 115-132, 2016.

LUZINA, O. A.; SALAKHUTDINOV, N. F. Usonic acid and its derivatives for pharmaceutical use: a patent review (2000–2017). **Expert opinion on therapeutic patents**, v. 28, n. 6, p. 477-491, 2018.

MA, Y. *et al.* Effect of chitosan coating on the properties of nanoliposomes loaded with oyster protein hydrolysates: Stability during spray-drying and freeze-drying. **Food Chemistry**, v. 385, e. 132603, 2022.

MAHMOUDI, H. *et al.* Identification of quinolone and colistin resistance genes in *Escherichia coli* strains isolated from mucosal samples of patients with colorectal cancer and healthy subjects. **Recent patents on anti-infective drug discovery**, v. 15, n. 1, p. 30-40, 2020.

- MALAEKEH-NIKOUEI, B. *et al.* The role of nanotechnology in combating biofilm-based antibiotic resistance. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 60, p. 101880, 2020.
- MANNA, S. *et al.* Probing the mechanism of bupivacaine drug release from multivesicular liposomes. **Journal of controlled release**, v. 294, n. 1, p. 279-287, 2019.
- MARTINEZ, M. N.; AMIDON, G. L. A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of Fundamentals. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 42, n. 1, p. 620–643, 2002.
- MAULIDIYAH, M. *et al.* Potential of Usnic Acid Compound from Lichen Genus *Usnea* sp. as Antidiabetic Agents. **Journal of Oleo Science**, v. 71, n. 1, p. 127-134, 2021.
- MCGEECHAN, G. J., *et al.* A systematic review and qualitative synthesis of the experience of living with colorectal cancer as a chronic illness. **Psychology & health**, v. 2021, n. 1, p. 1-25, 2021.
- MEHANNA, M. M.; ELMARADNY, H. A.; SAMAHA, M. W. Mucoadhesive liposomes as ocular delivery system: physical, microbiological, and in vivo assessment. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 36, n. 1, p. 108-118, 2010.
- MEHTA, D.; SHARMA, A. K. Cephalosporins: a review on imperative class of antibiotics. **Inventi Rapid: Molecular Pharmacology**, v. 1, n. 1, p. 1-6, 2016.
- MENG, R. *et al.* Preparation and characterization of zein/carboxymethyl dextrin nanoparticles to encapsulate curcumin: Physicochemical stability, antioxidant activity and controlled release properties. **Food Chemistry**, v. 340, e-127893, 2021.
- MIETHKE, M. *et al.* Towards the sustainable discovery and development of new antibiotics. **Nature Reviews Chemistry**, v. 5, n. 10, p. 726-749, 2021.
- MIRZAEI, R. *et al.* Bacterial biofilm in colorectal cancer: What is the real mechanism of action?. **Microbial Pathogenesis**, v. 142, n. 1, p. 104052, 2020.
- MOHAMED, A. *et al.* Drug–Microbiota Interaction in Colon Cancer Therapy: Impact of Antibiotics. **Biomedicines**, v. 9, n. 3, p. 1-13, 2021.
- MOKDAD, R. *et al.* Anti-inflammatory effects of free and liposome-encapsulated natural Algerian thermal water in RAW 264.7 macrophages. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 121452, 2022.
- MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International journal of pharmaceutics**, v. 385, n. 1-2, p. 113-142, 2010.
- MOUSSOUT, H. *et al.* Kinetics and mechanism of the thermal degradation of biopolymers chitin and chitosan using thermogravimetric analysis. **Polymer Degradation and Stability**, v. 130, n. 1, p. 1-9, 2016.
- MOYÁ, M. L. *et al.* Preparation and characterization of new liposomes. Bactericidal activity of cefepime encapsulated into cationic liposomes. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 2, p. 69-75, 2019.

NAHR, F. K. *et al.* Food grade nanostructured lipid carrier for cardamom essential oil: Preparation, characterization and antimicrobial activity. **Journal of Functional Foods**, v. 40, n. 1, p. 1-8, 2018.

NKANGA, C. I. *et al.* Preparation and characterization of isoniazid-loaded crude soybean lecithin liposomes. **International journal of pharmaceutics**, p. 526, n. 1-2, p. 466-473, 2017.

NAQVI, S.; PANGHAL, A.; FLORA, S. J. S. Nanotechnology: a promising approach for delivery of neuroprotective drugs. **Frontiers in neuroscience**, v. 14, p. 494-502, 2020.

NASCIMENTO, T. *et al.* Trends in nanomedicines for cancer treatment. **Current pharmaceutical design**, v. 26, n. 29, p. 3579-3600, 2020.

NGUYEN, T. *et al.* Liquid chromatographic method to follow-up ceftazidime and pyridine in portable elastomeric infusion pumps over 24 h. **Electrophoresis**, v. 2021, p. 1-8, 2021.

NGUYEN, T. X. *et al.* Chitosan-coated nano-liposomes for the oral delivery of berberine hydrochloride. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, n. 41, p. 7149-7159, 2014.

NIAZ, T. *et al.* Potential of polymer stabilized nano-liposomes to enhance antimicrobial activity of nisin Z against foodborne pathogens. **LWT**, v. 96, n. 1, p. 98-110, 2018.

NIU, M. *et al.* Hypoglycemic activity and oral bioavailability of insulin-loaded liposomes containing bile salts in rats: the effect of cholate type, particle size and administered dose. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 81, n. 2, p. 265-272, 2012.

NUNES, P. S. *et al.* Gelatin-based membrane containing usnic acid-loaded liposome improves dermal burn healing in a porcine model. **International journal of pharmaceutics**, v. 513, n. 1-2, p. 473-482, 2016.

NUNES, P. *et al.* Thermal characterization of usnic acid/collagen-based films. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 99, n. 3, p. 1011-1014, 2010.

O'NEIL, B. H. *et al.* Safety and antitumor activity of the anti-PD-1 antibody pembrolizumab in patients with advanced colorectal carcinoma. **PLoS one**, v. 12, n. 1, p. 1-7, 2017.

OBSERVATÓRIO DE ONCOLOGIA (OO). **Quanto custa tratar um paciente com câncer no SUS em 2016**. Disponível em: <<https://observatoriodeoncologia.com.br/quanto-custa-tratar-um-paciente-com-cancer-no-sus-em-2016/>> Acesso em: 27 de dezembro de 2021.

OSORIO, L. R. *et al.* Evaluation of physico-chemical properties and antimicrobial synergic effect of ceftazidime-modified chitosan. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 134, n. 3, p. 1629-1636, 2018.

OVERMAN, M. J. *et al.* Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. **Lancet oncology**, v. 18, n. 1, p. 1182-1191, 2017.

- ÖZOGUL, Y.; ABED, N.; ÖZOGUL, F. Antimicrobial effect of laurel essential oil nanoemulsion on food-borne pathogens and fish spoilage bacteria. **Food Chemistry**, v. 368, p. 130831, 2022.
- PAGANO, C. *et al.* Bioadhesive polymeric films based on usnic acid for burn wound treatment: Antibacterial and cytotoxicity studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 178, p. 488-499, 2019.
- PAN, L. *et al.* Whey protein isolate coated liposomes as novel carrier systems for astaxanthin. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 122, n. 4, p. 1900325, 2020.
- PARIKH, A. R. *et al.* MAVERICC, a randomized, biomarker-stratified, phase II study of mFOLFOX6-bevacizumab versus FOLFIRI-bevacizumab as first-line chemotherapy in metastatic colorectal cancer. **Clinical cancer research**, v. 25, n. 1, p. 2988-2995, 2019.
- PATIL, A. *et al.* Nanotechnology derived nanotools in biomedical perspectives: An update. **Current Nanoscience**, v. 15, n. 2, p. 137-146, 2020.
- PEDZIWIATR-WERBICKA, E. *et al.* Dendrimers and hyperbranched structures for biomedical applications. **European Polymer Journal**, v. 119, p. 61-73, 2019.
- PERLI, G. *et al.* Ionic strength for tailoring the synthesis of monomodal stealth cationic liposomes in microfluidic devices. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 179, n. 1, p. 233-241, 2019.
- PETERS, M. *et al.* Size-dependent properties of functional PPV-based conjugated polymer nanoparticles for bioimaging. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 169, p. 494-501, 2016.
- PHAM, J. V. *et al.* A review of the microbial production of bioactive natural products and biologics. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 1404, 2019.
- PIAWAH, S.; VENOOK, A. P. Targeted therapy for colorectal cancer metastases: A review of current methods of molecularly targeted therapy and the use of tumor biomarkers in the treatment of metastatic colorectal cancer. **Cancer**, v. 125, n. 23, p. 4139-4147, 2019.
- POGUE, J. M.; BONOMO, R. A.; KAYE, K. S. Ceftazidime/avibactam, meropenem/vaborbactam, or both? Clinical and formulary considerations. **Clinical Infectious Diseases**, v. 68, n. 3, p. 519-524, 2019.
- POGUE, J. M.; BONOMO, R. A.; KAYE, K. S. Ceftazidime/avibactam, meropenem/vaborbactam, or both? Clinical and formulary considerations. **Clinical Infectious Diseases**, v. 68, n. 3, p. 519-524, 2019.
- PRABAHAR, K. Antibiotics utilization pattern in pediatrics in a tertiary care teaching hospital. **Asian journal of pharmaceuticals**, v. 11, n. 1, p. 1-5, 2017.
- PU, C.; TANG, W. A chitosan-coated liposome encapsulating antibacterial peptide, Apep10: Characterisation, triggered-release effects and antilisterial activity in thaw water of frozen chicken. **Food & function**, v. 7, n. 10, p. 4310-4322, 2016.

PUBCHEM. NIH – U.S. National Library of Medicine. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/27447>>. Acesso em 30 de dezembro de 2021.

PUBCHEM. NIH – U.S. National Library of Medicine. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5481173>>. Acesso em 30 de dezembro de 2021.

PUBCHEM. NIH – U.S. National Library of Medicine. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5646>>. Acesso em 10 de janeiro de 2022.

PUBCHEM. NIH – U.S. National Library of Medicine. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/71853>>. Acesso em 12 de janeiro de 2022.

QU, C. *et al.* Preparation and evaluation of wet-milled usnic acid nanocrystal suspension for better bioaffinity. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 44, n. 5, p. 707-712, 2018.

RAINS, C. P.; BRYSON, H. M.; PETERS, D. H. Ceftazidime. **Drugs**, v. 49, n. 4, p. 577-617, 1995.

RAMEZANZADE, L. *et al.* Cross-linked chitosan-coated liposomes for encapsulation of fish-derived peptide. **LWT**, v. 150, e-112057, 2021.

RAN, L. *et al.* Synergistic antioxidant effect of glutathione and edible phenolic acids and improvement of the activity protection by coencapsulation into chitosan-coated liposomes. **LWT**, v. 127, e-109409, 2020.

REIS, L. E. S. *et al.* Mixed formulation of conventional and pegylated meglumine antimoniate-containing liposomes reduces inflammatory process and parasite burden in *Leishmania infantum*-infected BALB/c mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 11, e00962-17, 2017.

RIJKMANS, E. C. *et al.* Endorectal brachytherapy boost after external beam radiation therapy in elderly or medically inoperable patients with rectal cancer: primary outcomes of the phase 1 HERBERT study. **International journal of radiation oncology, biology, physics**, v. 98, p. 908-917, 2017.

ROSKOSKI, R. J. Small molecule inhibitors targeting the EGFR/ErbB family of protein-tyrosine kinases in human cancers. **Pharmaceutical research**, v. 139, n. 1, p. 395–411, 2019.

RUAN, W. *et al.* Healthy human gastrointestinal microbiome: composition and function after a decade of exploration. **Digestive diseases and sciences**, v. 65, n. 3, p. 695-705, 2020.

RUYSSCHER, D. *et al.* Radiotherapy toxicity. **Nature reviews disease primers**, v. 5, n. 1, p. 1-20, 2019.

SADECKI, P. W. *et al.* Evolution of polymyxin resistance regulates colibactin production in *Escherichia coli*. **ACS Chemical Biology**, v. 16, n. 7, p. 1243-1254, 2021.

SAĞIROĞLU, A. A. Chitosan-coated liposome-containing carbamazepine and coenzyme Q10: design, optimization and evaluation. **Journal of Liposome Research**, v. 31, n. 4, p. 389-398, 2021.

SAIKIA, J.; GOGOI, A.; BARUAH, S. **Nanotechnology for water remediation. In Environmental Nanotechnology** (p. 195-211). Springer, Cham, 2019.

SANTANA, M. S. A. *et al.* Stability of ceftazidime pentahydrate investigated by thermal analysis techniques. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 109, n. 3, p. 1324-1329, 2020.

SARASWAT, A. L.; MAHER, T. J. Development and optimization of stealth liposomal system for enhanced *in vitro* cytotoxic effect of quercetin. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 101477, 2020.

SAUS, E. *et al.* Microbiome and colorectal cancer: Roles in carcinogenesis and clinical potential. **Molecular aspects of medicine**, v. 69, n. 1, p. 93-106, 2019.

SCHIFFELERS, R. M. *et al.* *In vivo* synergistic interaction of liposome-coencapsulated gentamicin and ceftazidime. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 298, n. 1, p. 369-375, 2001.

SCHMITT, M.; GRETEN, F. R. The inflammatory pathogenesis of colorectal cancer. **Nature Reviews Immunology**, v. 21, p. 653–667, 2021.

SCHNEIDER, K.; RESL, P.; SPRIBILLE, T. Escape from the cryptic species trap: lichen evolution on both sides of a cyanobacterial acquisition event. **Molecular ecology**, v. 25, n. 14, p. 3453-3468, 2016.

SENEL, S.; YUKSEL, S. Chitosan-based particulate systems for drug and vaccine delivery in the treatment and prevention of neglected tropical diseases. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 18, p. 1-31, 2020.

SEYEDABADI, M. M. *et al.* Development and characterization of chitosan-coated nanoliposomes for encapsulation of caffeine. **Food Bioscience**, v. 40, e. 100857, 2021.

SHAHBAZ, K. Cephalosporins: pharmacology and chemistry. **Pharmaceutical and Biological Evaluations**, v. 4, n. 6, 234-238, 2017.

SHAKER, E.; NASR, G. M.; MOAWAD, M. Gene expression profiles of some prognostic markers in a human breast cell line (MCF7) exposed to Curcumin nanoparticles and nanocapsules. **bioRxiv**, 2022.

SHARILATINIA, Z.; JALALI, A. M. Chitosan-based hydrogels: Preparation, properties and applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 115, n. 1, p. 194-2020, 2018.

SHETTY, S. A. *et al.* Intestinal microbiome landscaping: insight in community assemblage and implications for microbial modulation strategies. **FEMS microbiology reviews**, v. 41, n. 2, p. 182-199, 2017.

SHIBATA, S. *et al.* Relation between chemical constitutions and antibacterial effects of usnic acid and its derivatives. **The Japanese Medical Journal**, v. 1, n. 2, p. 152-155, 1948.

- SHIELDS, C. E. D. *et al.* Reduction of murine colon tumorigenesis driven by enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* using cefoxitin treatment. **The journal of infectious diseases**, v. 214, n. 1, p. 122-129, 2016.
- SHIRLEY, M. Ceftazidime-avibactam: a review in the treatment of serious gram-negative bacterial infections. **Drugs**, v. 78, n. 6, p. 675-692, 2018.
- SI, K. *et al.* Effects of (+)-usnic acid and (+)-usnic acid-liposome on *Toxoplasma gondii*. **Experimental parasitology**, v. 166, p. 68-74, 2016.
- SIENIAWSKA, E. *et al.* Usnic Acid Treatment Changes the Composition of *Mycobacterium tuberculosis* Cell Envelope and Alters Bacterial Redox Status. **Msystems**, v. 6, n. 3, e00097-21, 2021.
- SILVA, J. E. B. *et al.* Vantagens da utilização de antibióticos encapsulados em lipossomas para o combate de infecções causadas por enterobactérias. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 6, e15010615439, 2021.
- SOMASEKHAR, T. *et al.* Synthesis of novel anti-inflammatory usnic acid-based imidazolium salts. **European chemical bulletin**, v. 10, n. 1, p. 67-72, 2021.
- SONG, M. *et al.* The potential role of exercise and nutrition in harnessing the immune system to improve colorectal cancer survival. **Gastroenterology**, v. 155, n. 3, p. 596-600, 2018.
- SONI, K.; RIZWANULLAH, M.; KOHLI, K. Development and optimization of sulforaphane-loaded nanostructured lipid carriers by the Box-Behnken design for improved oral efficacy against cancer: *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* assessments. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 15-31, 2018.
- SØREIDE, K. High-fidelity of five quasimonomorphic mononucleotide repeats to high-frequency microsatellite instability distribution in early-stage adenocarcinoma of the colon. **Anticancer research**, v. 31, n. 3, p. 967-971, 2011.
- SOUZA, J. B. *et al.* **Lipossomas revestidos com quitosana: uma estratégia promissora para a liberação de antimicrobianos.** In: Pesquisas em temas de ciências da saúde. RFB editora, v. 3, p. 47-56, 2020.
- SREEDHAR, M. *et al.* Influence of γ -radiation stress on scavenging enzyme activity and cell ultra-structure in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). **Advances in Applied Science Research**, v. 4, n. 2, p. 35-44, 2013.
- STEPANOVIĆ, S. *et al.* A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, n. 2, p. 175-179, 2000.
- STERNBACH, N. *et al.* Efficacy and safety of ceftazidime/avibactam: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 8, p. 2021-2029, 2018.
- SUBRAMANI, T.; GANAPATHYSWAMY, H. An overview of liposomal nano-encapsulation techniques and its applications in food and nutraceutical. **Journal of Food Science and Technology**, v. 30, p. 1-11, 2020.
- SUN, Q. *et al.* Rational design of cancer nanomedicine: nanoproperty integration and synchronization. **Advanced Materials**, v. 29, n. 14, p. 1606628, 2017.

- SUO, R. *et al.* The effects of dyadic coping and marital satisfaction on posttraumatic growth among breast cancer couples. **Supportive Care in Cancer**, v. 2021, p. 1-9, 2021.
- SUZUKI, H.; MORI, H. World trends for *H. pylori* eradication therapy and gastric cancer prevention strategy by *H. pylori* test-and-treat. **Journal of gastroenterology**, v. 53, n. 3, p. 354-361, 2018.
- SVEEN, A.; KOPETZ, S.; LOTHE, R. A. Biomarker-guided therapy for colorectal cancer: strength in complexity. **Nature reviews clinical oncology**, v. 17, n. 1, p. 11-32, 2020.
- TABERNERO, J. *et al.* Phase I dose-escalation study of JNJ-42756493, an oral pan-fibroblast growth factor receptor inhibitor, in patients with advanced solid tumors. **Journal of clinical oncology**, v. 33, n. 30, p. 3401-3408, 2015.
- TACCONELLI, E. *et al.* Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 318-327, 2018.
- TAM, S. Y.; VINCENT, W. C. W. A review on the special radiotherapy techniques of colorectal cancer. **Frontiers in oncology**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2019.
- TANG, L. *et al.* *E. coli* diversity: low in colorectal cancer. **BMC medical genomics**, v. 13, n. 1, p. 1-17, 2020.
- TANG, P. A. *et al.* Phase II clinical and pharmacokinetic study of aflibercept in patients with previously treated metastatic colorectal cancer. **Clinical cancer research**, v. 18, n. 1, p. 6023-6031, 2012.
- TEMRAZ, S. *et al.* Gut microbiome: A promising biomarker for immunotherapy in colorectal cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 17, p. 4155-4168, 2019.
- THAHER, Y. A.; PERNI, S.; PROKOPOVICH, P. **Nanotechnology-based antimicrobial drug delivery system for orthopaedic application**. In: Orthopaedic Proceedings, v. 101, n. 2, p. 13-13. The British Editorial Society of Bone & Joint Surgery, 2019.
- THANOU, M.; VERHOEF, J.; JUNGINGER, H. Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 52, n. 2, p. 117-126, 2001.
- THOMAS, J.; LEAL, A.; OVERMAN, M. J. Clinical development of immunotherapy for deficient mismatch repair colorectal cancer. **Clinical colorectal cancer**, v. 19, n. 2, p. 73-81, 2020.
- THRUMURTHY, S. G. *et al.* Colorectal adenocarcinoma: risks, prevention and diagnosis. **BMJ**, v. 354, p. 1-12, 2016.
- THYAGARAJAN, R. *et al.* Evaluation of *in vitro* drug controlled release of biocompatible metallic and non metallic nanoparticles incorporated anti bacterial antibiotics and their anti biofilm activity against *E. coli*. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 8, n. 3, p. 316, 2015.

TIAN, Y. *et al.* Overcoming drug-resistant lung cancer by paclitaxel-loaded hyaluronic acid-coated liposomes targeted to mitochondria. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 44, n. 12, p. 2071-2082, 2018.

TIWARI, A. *et al.* Novel targeting approaches and signaling pathways of colorectal cancer: An insight. **World journal of gastroenterology**, v. 24, n. 1, p. 4428-4435, 2018.

TJALSMA, H. *et al.* A bacterial driver–passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. **Nature reviews microbiology**, v. 10, n. 8, p. 575-582, 2012.

TORRE, L. A. *et al.* Global cancer statistics, 2012. **CA: A cancer journal for clinicians**, v. 65, n. 1, p. 87-108, 2015.

TORRES, I. M. S. *et al.* Preparation, characterization and *in vitro* antimicrobial activity of liposomal ceftazidime and cefepime against *Pseudomonas aeruginosa* strains. **Brazilian journal of microbiology**, v. 43, n. 3, p. 984-992, 2012.

TRAN, B. T. *et al.* The direct and indirect costs of colorectal cancer in Vietnam: an economic analysis from a social perspective. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 1, p. 1- 12, 2021.

TROUDI, A. *et al.* Antibiotic adjuvants to rescue *Pseudomonas aeruginosa* from tetracycline antibiotics resistance. **Anti-Infective Agents**, v. 19, n. 1, p. 110-116, 2021.

TYERS, M.; WRIGHT, G. D. Drug combinations: a strategy to extend the life of antibiotics in the 21st century. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 141-155, 2019.

UMAR, A. K. *et al.* Film-Forming spray of water-soluble chitosan containing liposome-coated human epidermal growth factor for wound healing. **Molecules**, v. 26, n. 17, p. 5326, 2021.

UYL-DE GROOT, C. A. *et al.* Realworld cost-effectiveness of cetuximab in the third-line treatment of metastatic colorectal cancer based on patient chart review in the Netherlands. **Health economics review**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2018.

VAHED, S. Z. *et al.* Liposome-based drug co-delivery systems in cancer cells. **Materials Science and Engineering: C**, v. 71, n. 1, p. 1327-1341, 2017.

VAHEDIKIA, N. *et al.* Biodegradable zein film composites reinforced with chitosan nanoparticles and cinnamon essential oil: Physical, mechanical, structural and antimicrobial attributes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 177, p. 25-32, 2019.

VAN CUTSEM, E. *et al.* Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. **Journal of clinical oncology**, v. 25, n. 13, p. 1658-1664, 2007.

VANIĆ, Ž. *et al.* Azithromycin-liposomes as a novel approach for localized therapy of cervicovaginal bacterial infections. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 5957-5966, 2019.

VASAPOLLI, R. *et al.* Analysis of transcriptionally active bacteria throughout the gastrointestinal tract of healthy individuals. **Gastroenterology**, v. 157, n. 4, p. 1081-1092, 2019.

VASCONCELOS, N. G. *et al.* Antibacterial activity and synergism of the essential oil of *Nectandra megapotamica* (L.) flowers against OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 32, n. 3, p. 260-268, 2020.

VECCHIONE, L. *et al.* EGFR-targeted therapy. **Experimental cell research**, v. 317, n. 19, p. 2765-2771, 2011.

VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **Pharmacy and therapeutics**, v. 40, n. 4, p. 277, 2015.

VIALE, G. *et al.* Mismatch repair deficiency as a predictive biomarker for immunotherapy efficacy. **BioMed research international**, v. 7, p. 34546–34557 2017.

WACKER, M. G. Frontiers in pharmaceutical nanotechnology. **Beilstein journal of nanotechnology**, v. 10, n. 1, p. 2538-2540, 2019.

WAN, B. *et al.* Alginate lyase guided silver nanocomposites for eradicating *Pseudomonas aeruginosa* from lungs. **ACS applied materials & interfaces**, v. 12, n. 8, p. 9050-9061, 2020.

WANG, H. *et al.* Cancer radiosensitizers. **Trends in pharmacological sciences**, v. 39, n. 1, p. 24-48, 2018.

WANG, M. *et al.* Ursolic acid liposomes with chitosan modification: Promising antitumor drug delivery and efficacy. **Materials science and engineering: C**, v. 71, p. 1231-1240, 2017.

WANG, Q. *et al.* Enhancement of oral bioavailability and hypoglycemic activity of liquiritin-loaded precursor liposome. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 592, p. 120036-120036, 2021.

WCRF/AICR. **Diet, nutrition, physical activity and cancer: a global perspective. Continuous Update Project Expert Report 2018**. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research, 2018.

WIECZORSKA, K.; STOLAREK, M.; STEC, R. The role of the gut microbiome in colorectal cancer: where are we? Where are we going?. **Clinical colorectal cancer**, v. 19, n. 1, p. 5-12, 2020.

WIJESOORIYA, C. *et al.* Optimization of liposomal encapsulation for ceftazidime for developing a potential eye drop formulation. **Journal of Basic and Clinical Pharmacy**, v. 4, n. 3, p. 73-85, 2013.

WILD, C. P.; WEIDERPASS, E.; STEWART, B. W. **World cancer report: cancer research for cancer prevention**. In: International agency for research on cancer, 23-33, 2020.

WILLIAM, B. *et al.* Supercritical fluid methods: An alternative to conventional methods to prepare liposomes. **Chemical Engineering Journal**, v. 383, n. 1, p. 123106, 2020.

XIE, Y. H.; CHEN, Y. X.; FANG, J. Y. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 5, n. 1, p. 1-30, 2020.

YANG, J. *et al.* Development of a colorectal cancer diagnostic model and dietary risk assessment through gut microbiome analysis. **Experimental & molecular medicine**, v. 51, n. 10, p. 1-15, 2019.

YANG, Z. **Liposomes and Their Application in the Delivery of Herbal Active Ingredients**. In: Novel Drug Delivery Systems for Chinese Medicines, p. 153-173. Springer, Singapore, 2021.

YIXIA, Y. *et al.* The alterations of microbiota and pathological conditions in the gut of patients with colorectal cancer undergoing chemotherapy. **Anaerobe**, e. 102361, 2021.

YOKOTA, D. *et al.* Characterization of lyophilized liposomes produced with non-purified soy lecithin: a case study of casein hydrolysate microencapsulation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, p. 325-335, 2012.

YU, J. *et al.* Metagenomic analysis of faecal microbiome as a tool towards targeted non-invasive biomarkers for colorectal cancer. **Gut**, v. 66, n. 1, p. 70-78, 2017.

YU, T. *et al.* Oral administration of liposome-apatinib and locally delivery of docetaxel/MPEG-PCL by fibrin glue synergistically improve therapeutic effect in colorectal cancer. **Journal of biomedical nanotechnology**, v. 14, n. 12, p. 2077-2091, 2018.

ZACKULAR, J. P. *et al.* The human gut microbiome as a screening tool for colorectal cancer. **Cancer prevention research**, v. 7, n. 11, p. 1112-1121, 2014.

ZHANG, Y. *et al.* Layer-by-layer coated nanoliposomes for oral delivery of insulin. **Nanoscale**, v. 13, n. 2, p. 776-789, 2021.

ZHANG, Y. **The use of quorum quenching enzymes and quorum sensing inhibitors to combat *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* biofilm-related infections**. Tese de doutorado, Ghent University, 2018.

ZHANG, Y.; CHEN, Z.; LI, J. The current status of treatment for colorectal cancer in China: A systematic review. **Medicine**, v. 96, n. 40, e8242, 2017.

ZHAO, B. *et al.* Mechanisms of resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 3, p. 3980-4000, 2017.

ZHAO, M. *et al.* Enhanced oral absorption of sorafenib via the layer-by-layer deposition of a pH-sensitive polymer and glycol chitosan on the liposome. **International journal of pharmaceuticals**, v. 544, n. 1, p. 14-20, 2018.

ZHOU, F. *et al.* Chitosan-coated liposomes as delivery systems for improving the stability and oral bioavailability of acteoside. **Food Hydrocolloids**, v. 83, n. 1, p. 17-24, 2018.

ZHOU, L. *et al.* Physiologically based pharmacokinetic modelling to predict exposure differences in healthy volunteers and subjects with renal impairment: Ceftazidime case study. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 125, n. 2, p. 100-107, 2019.

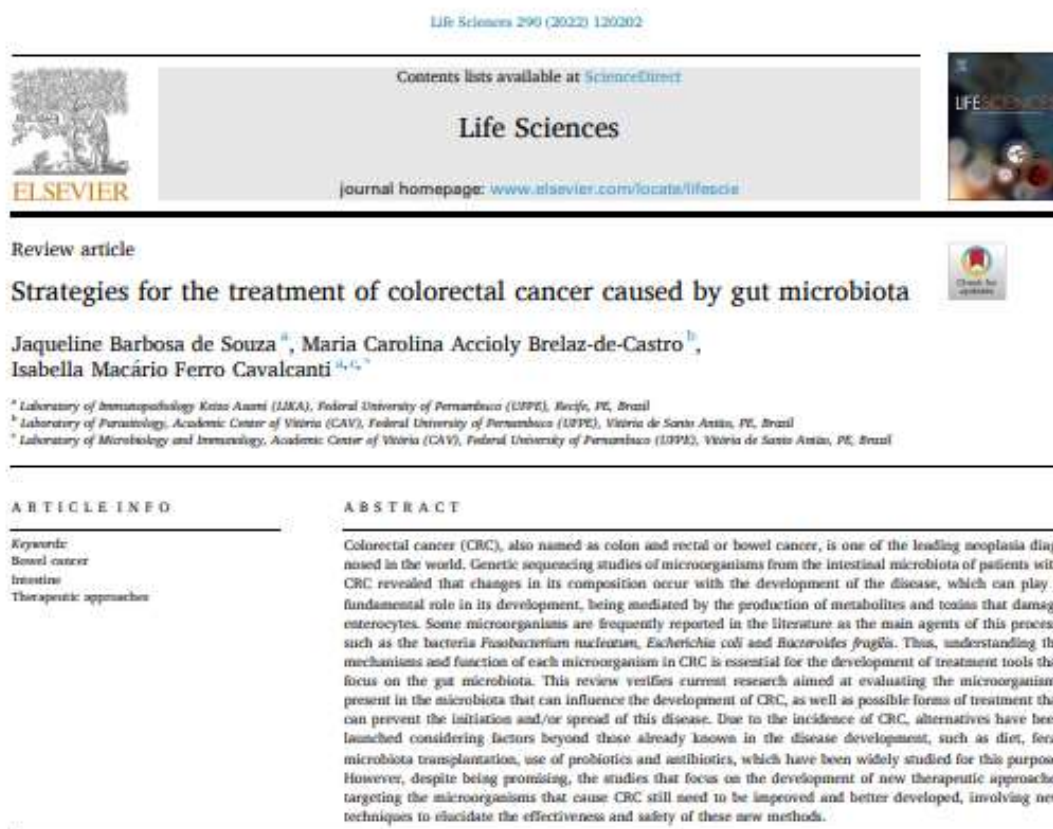
ZHOU, W. *et al.* The formation of chitosan-coated rhamnolipid liposomes containing curcumin: Stability and in vitro digestion. **Molecules**, v. 26, n. 3, p. 560-571, 2021.

ZOU, S.; FANG, L.; LEE, M. H. Dysbiosis of gut microbiota in promoting the development of colorectal cancer. **Gastroenterology report**, v. 6, n. 1, p. 1-12, 2018.

ZUO, G. Y. *et al.* Potentiation effects by usnic acid in combination with antibiotics on clinical multi-drug resistant isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Medicinal Chemistry Research**, v. 27, n. 5, p. 1443-1448, 2018.

APÊNDICE A: ARTIGO DE REVISÃO

Publicado na revista Life Sciences (Qualis A1, fator de impacto 5,03)



1. Introduction

The human intestine is home to an ecosystem of microorganisms, called the gut microbiota, which has bacteria, viruses, fungi and may have other eukaryotes such as protozoa [1,2]. They interact with its host through the establishment of a mutualistic symbiosis relationship, contributing in various ways such as nutrient absorption and metabolism, immunity and vitamin production [3].

It was recently discovered that through mechanisms that alter the composition of this system, called dysbiosis, it is possible to develop several diseases in the intestinal region, such as inflammatory bowel disease, Crohn's disease and colorectal cancer (CRC) [4]. CRC is one of the main causes of death attributed to cancer, being the result of hereditary or sporadic genetic mutations, which present initial manifestations such as local inflammation, polyps and, finally, carcinoma [5,6].

Several theories have been used to support the association of

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC), also named as colon and rectal or bowel cancer, is one of the leading neoplasia diagnosed in the world. Genetic sequencing studies of microorganisms from the intestinal microbiota of patients with CRC revealed that changes in its composition occur with the development of the disease, which can play a fundamental role in its development, being mediated by the production of metabolites and toxins that damage enterocytes. Some microorganisms are frequently reported in the literature as the main agents of this process, such as the bacteria *Fusobacterium nucleatum*, *Escherichia coli* and *Bacteroides fragilis*. Thus, understanding the mechanisms and function of each microorganism in CRC is essential for the development of treatment tools that focus on the gut microbiota. This review verifies current research aimed at evaluating the microorganisms present in the microbiota that can influence the development of CRC, as well as possible forms of treatment that can prevent the initiation and/or spread of this disease. Due to the incidence of CRC, alternatives have been launched considering factors beyond those already known in the disease development, such as diet, fecal microbiota transplantation, use of probiotics and antibiotics, which have been widely studied for this purpose. However, despite being promising, the studies that focus on the development of new therapeutic approaches targeting the microorganisms that cause CRC still need to be improved and better developed, involving new techniques to elucidate the effectiveness and safety of these new methods.

microbiota microorganisms with the emergence of CRC. The most reported in the literature are the production of biofilms, toxins – such as the genotoxin colibactin produced by *Escherichia coli*, that once healthy cells are exposed to this toxin, DNA damage, increased cell senescence and proliferation of tumor cells are demonstrated [7–9]. The other is the modulation of inflammation and the immune system by *Fusobacterium nucleatum*, which can act synergistically or individually to stimulate uncontrolled cell proliferation and DNA damage [4,10].

Thus, *in vitro*, *in vivo* and clinical studies have been developed to elucidate the main microorganisms associated with this carcinogenesis and to explore its usefulness in screening for CRC, since depending on the moment of diagnosis of this disease, the individual may have an increase or decrease of their average survival time [11–13]. Thus, knowledge about this theme can also be useful for the development of new treatments in addition to the conventional ones such as chemotherapy, radiotherapy and immunotherapy, since it is already known

* Corresponding author at: Federal University of Pernambuco, Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901 Recife, PE, Brazil.

E-mail address: isabella.cavalcanti@ufpe.br (I.M.F. Cavalcanti).

<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.120202>

Received 27 September 2021; Received in revised form 19 November 2021; Accepted 29 November 2021

Available online 8 December 2021

0024-3205/© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.