



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN FARMACIA

TESI DI LAUREA

**ACIDO USNICO: CHIMICA, ATTIVITÀ E
APPLICAZIONI**

RELATORE: PROF.SSA RAFFAELLA FILIPPINI

LAUREANDA: ELISA BANZATO

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

INDICE

INTRODUZIONE	3
CAPITOLO 1	6
PROPRIETÀ CHIMICHE	6
CAPITOLO 2	13
PROPRIETÀ BIOLOGICHE	13
<i>ATTIVITÀ ANTIMICOTICHE</i>	13
<i>ATTIVITÀ ANTIBATTERICA</i>	13
<i>ATTIVITÀ ANTIVIRALE</i>	18
<i>ATTIVITÀ ANTIPARASSITARIA</i>	19
<i>ATTIVITÀ ANTITUMORALE</i>	20
ALTRE ATTIVITÀ	22
<i>GASTROPROTETTIVA</i>	22
<i>CICATRIZZANTE, ANTIOSSIDANTE E ANTINFIAMMATORIA</i>	22
CAPITOLO 3	25
TOSSICITÀ ACIDO USNICO E MECCANISMO D’AZIONE	25
CAPITOLO 4	34
APPLICAZIONI NANOTECNOLOGICHE	34
CONCLUSIONE	50
BIBLIOGRAFIA	52

INTRODUZIONE

Nel corso degli anni la comunità scientifica si è interessata sempre in misura maggiore alla scoperta di nuove molecole con interessanti applicazioni farmacologiche, sia derivate da fonti naturali che da modificazioni chimiche di strutture preesistenti. Queste molecole bioattive possono essere estratte da animali, piante, alghe, batteri e funghi. Di notevole interesse si è dimostrato lo studio dei metaboliti del lichene.



Figura 1. *Ramalina fraxinea*

I licheni sono organismi simbiotici, costituiti da due diverse specie che traggono vantaggio l'una dall'altra, funghi e alghe e/o cianobatteri: il micobionte e il fotobionte.

Tale unione rappresenta una simbiosi ed è pertanto vantaggiosa per entrambi: l'alga produce tramite la fotosintesi carboidrati e altre sostanze da cui il fungo trae nutrimento, mentre riceve in cambio dal fungo acqua, sali minerali, protezione contro l'essiccamento e contro le radiazioni solari nocive. In tutti i licheni il fungo forma un tallo o stroma lichenizzato che può contenere composti secondari caratteristici.

I licheni sono i più antichi colonizzatori terrestri e mostrano una distribuzione in tutti i tipi di clima presenti nel mondo. Ad oggi sono note circa 17.000 specie di licheni e decine di nuove specie vengono scoperte ogni anno.

Recenti studi hanno dimostrato che i licheni sono in grado di deteriorare substrati rocciosi in breve tempo. Questi effetti sono dovuti a processi fisici e chimici in particolare all'escrezione di vari acidi organici come l'acido ossalico dal tallo.

La relazione simbiotica tra organismi così diversificati ha senza dubbio successo: i licheni si trovano in tutto il mondo coprendo circa l'8% della superficie terrestre, colonizzando una vasta gamma di substrati molto diversi tra loro (rocce, terra, foglie, corteccia, metallo, vetro) e sono in grado di sopravvivere in condizioni ambientali estreme.

La loro resistenza è principalmente dovuta ai seguenti fattori:

- capacità di sopravvivenza in uno stato di riposo metabolico per mesi;
- metabolismo lento;
- produzione di particolari molecole bioattive che offrono protezione chimica al lichene.

Alcuni metaboliti possono essere prodotti dal fungo o dall'alga mentre alcuni sono esclusivamente prodotti dall'azione sinergica delle due componenti.

Nel tallo si ha una grande concentrazione di prodotti fenolici tipica dei licheni la cui funzione sembra essere quella di proteggerli dagli erbivori.

Nel corso degli anni i licheni sono stati usati per vari scopi in particolare come coloranti, profumi e rimedi della medicina popolare e l'uso topico dei loro estratti ha origine nell'antico Egitto.

Come già evidenziato, gli estratti dei licheni sono stati usati per molti rimedi di medicina popolare, a tal proposito test di screening hanno indicato la presenza di metaboliti con attività antibiotica, anti-micobatterica, antivirale, antitumorale, antipiretica, analgesica.

Tra i metaboliti più importanti dei licheni ricordiamo: acidi alifatici, derivati dell'acido pulvinico, depsidi, depsidoni e i derivati del dibenzofurano.

Di questa ultima categoria di metaboliti a basso peso molecolare, l'acido usnico è stato quello più studiato. L'acido usnico (UA) è uno dei metaboliti dei licheni più abbondanti e più comuni, molto ben conosciuto come antibiotico, ma gli si annoverano molte altre rilevanti attività: antivirali, analgesiche, antitubercolari e insetticida.

Questo composto si trova in vari specie di licheni: in *Cladonia* (Cladoniaceae), *Usnea* (Usneaceae), *Lecanora* (Lecanoraceae), *Ramalina* (Ramalinaceae), *Parmelia* (Parmeliaceae), *Alectoria* (Alectoriaceae).

L'acido usnico è stato isolato per la prima volta nel 1843 dai licheni *Ramalina fraxinea* (Figura 1) e *Usnea barbata*; nel 1844 è stato caratterizzato come una sostanza con una denominazione specifica e nove decenni dopo ne è stata concordata la struttura chimica.

L'acido usnico è prodotto in grandi quantità nei licheni, rappresentando fino all'8% della sostanza secca del tallo. Il contenuto di UA nei licheni è soggetto a grandi fluttuazioni stagionali, il livello più alto è osservato alla fine della primavera e all'inizio dell'estate, mentre in autunno e in inverno i livelli sono generalmente bassi. È stata anche trovata una correlazione negativa tra l'età del tallo e la concentrazione di acido usnico.

Nel corso degli anni c'è stato un mutamento dell'interesse verso l'acido usnico e questo si evince soprattutto attraverso un'analisi della letteratura, che rivela una possibile suddivisione in tre periodi temporali (Figura 2).

Nel primo periodo, che va dalla fine della Seconda guerra mondiale alla fine degli anni '50, il numero di pubblicazioni era elevato, riflettendo il nuovo risvegliato interesse della comunità scientifica per l'acido usnico, concentrandosi principalmente sulle sue proprietà antibiotiche.

Il secondo periodo copre gli anni '60 e '70 e mostra un ridotto livello di interesse per l'acido usnico, probabilmente causato dal successo degli antibiotici sintetici, che erano prodotti facilmente ed economicamente molto più convenienti. Inoltre, la bassa solubilità in acqua dei derivati del lichene e la difficoltà di raccogliere licheni su larga scala, non incoraggiava l'uso di tali sostanze.

L'ultimo periodo che va dalla fine degli anni '80 ad oggi mostra un rinnovato interesse per l'acido usnico, probabilmente dovuto anche all'aumento dell'incidenza dell'antibiotico resistenza causata dall'uso intensivo degli stessi.

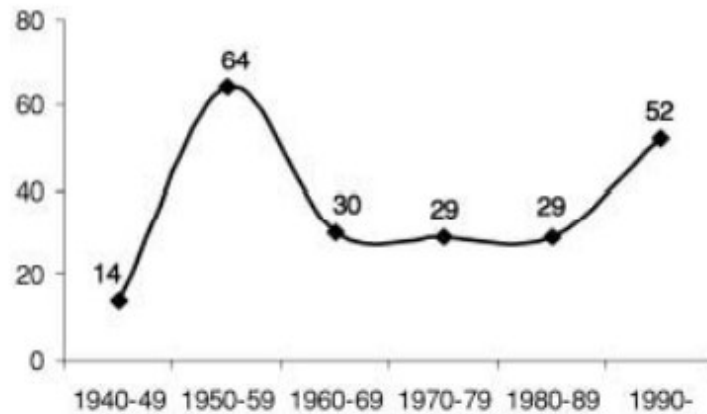


Figura 2. Pubblicazioni relative all'acido usnico nel corso degli anni

Nonostante il crescente interesse per questo metabolita del lichene, è anche nota la sua spiccata tossicità epatica, oltre ai fenomeni allergici e agli effetti teratogeni.

Per ridurre al minimo questi effetti collaterali sono state ricercate alternative innovative ed è risultato molto funzionale il loro incapsulamento in sistemi a rilascio controllato, i quali sono in grado di aumentare l'efficacia terapeutica riducendo al minimo gli effetti tossici, rappresentando quindi un interessante strumento per la nanotecnologia farmaceutica.

Scopo di questa tesi è svolgere una revisione della letteratura riguardo l'acido usnico approfondendone le proprietà chimiche e biologiche, la tossicità, il meccanismo d'azione e le applicazioni nanotecnologiche.

CAPITOLO 1

PROPRIETÀ CHIMICHE

L'acido usnico (Figura 3 e 4) è un pigmento giallo prodotto da diverse specie di licheni, è un derivato del dibenzofurano ed è un prodotto secondario del metabolismo del partner fungino.

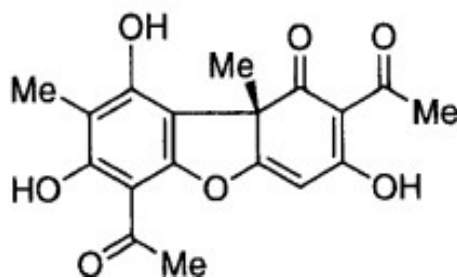


Figura 3. Struttura acido usnico

Esiste in due enantiomeri che differiscono per l'orientamento del gruppo metilico situato in posizione 9b. Entrambi gli enantiomeri presentano proprietà biologiche ma come riportato da Galanty *et al.* (2019) quale sia quello predominante è ancora una questione aperta.

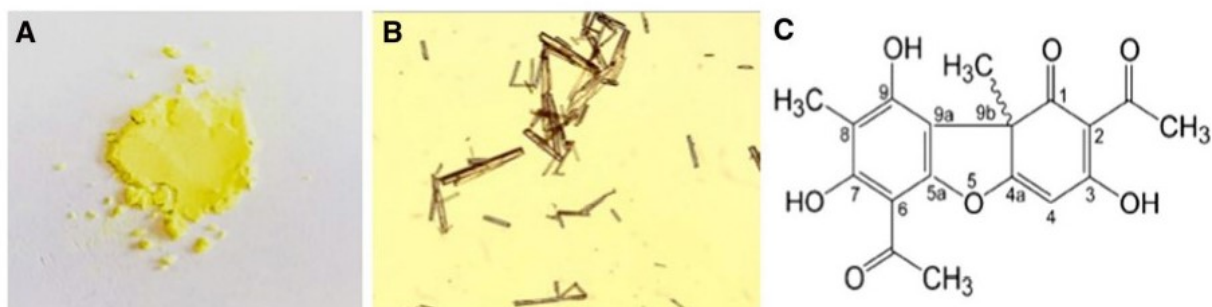


Figura 4. Aspetto macroscopico (A), aspetto microscopico (microscopio ottico 20x) (B) e struttura chimica (C)

L'acido usnico ha un carattere idrofobico con solubilità in acqua inferiore a 10 mg/100 mL a 25°C. Questa caratteristica può essere spiegata dalla presenza di tre gruppi chetonici, dell'anello furanico e dei ponti a idrogeno intramolecolari. La sua acidità è giustificata dalla presenza dell'anello fenolico, la cui struttura è instabile. Il valore della pKa per il gruppo 3-OH è 4,4 a causa dell'effetto induttivo del gruppo chetonico in posizione 1.

L'acidità del 9-OH fenolico (pKa 8.8) è aumentata da un effetto induttivo del gruppo acetile in para in posizione 6, mentre il 7-OH fenolico è debolmente acido (pKa 10.7), probabilmente a causa del suo coinvolgimento nel legame a idrogeno intramolecolare con il gruppo 6-acetile.

I metodi chiave per la preparazione di acido usnico sono l'estrazione dal lichene con solventi organici e successiva precipitazione del prodotto dall'estratto o la cristallizzazione. L'acido usnico è facilmente solubile in benzene, cloroformio, alcool pentilico e acido acetico glaciale; parzialmente solubile in etanolo, etere di petrolio ed etere etilico e insolubile in acqua.

La biosintesi dell'acido usnico (Figura 5) procede tramite acetato a polichetide a metilfloracetofenone, con incorporazione del frammento C1 prima dell'aromatizzazione (Taguchi *et al.*, 1969).

I passaggi successivi comportano accoppiamento fenolico ossidativo stereospecifico di due unità di metilfloracetofenone per dare acido usnico idrato e infine la disidratazione che porta alla formazione del legame etero.

All'acido usnico è legata una spiccata tossicità epatica, ma visti i suoi molti effetti benefici si è cercato di sintetizzarne degli analoghi che non avessero questa intrinseca tossicità.

I primi lavori di Shibata hanno confermato l'origine dell'acido usnico come derivato dell'acido acetico, attraverso la via dei polichetidi.

Ne è seguito quindi uno studio da parte di Hawranik *et al.* (2009) per cercare di caratterizzare l'enzima ossidativo coinvolto nella biosintesi dell'acido usnico e l'intermedio chiave della via.

Esperimenti con metilfloracetofenone marcato C14 hanno portato all'isolamento di acido usnico radioattivo confermando che il metilfloracetofenone fosse il suo precursore e quindi un intermedio essenziale, e che responsabile della sua biosintesi fosse una polichetide sintasi.

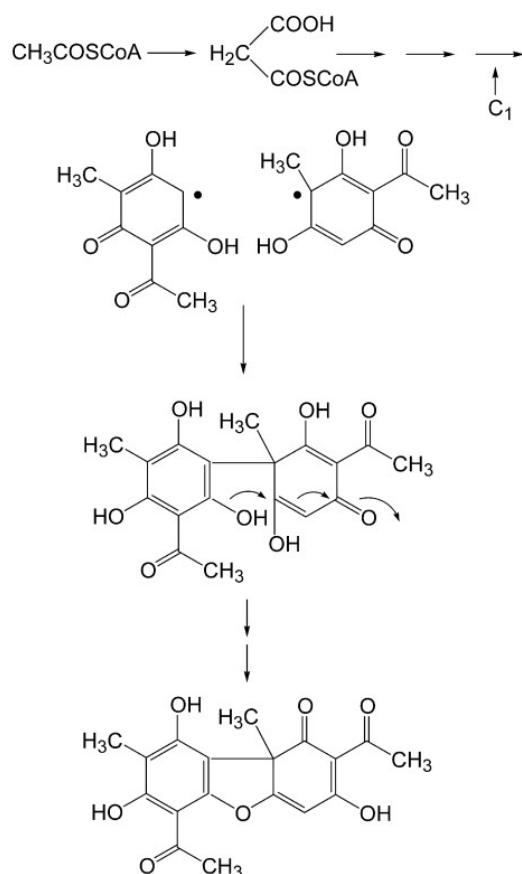


Figura 5. Biosintesi dell'acido usnico.

Obiettivo di questo lavoro era accedere alla sintesi di metilfloracetofenone in modo semplice. I ricercatori hanno incluso un'etichetta isotopica nel metilfloracetofenone per l'isolamento dell'enzima ossidativo e hanno dimostrato la possibilità di produrre acido usnico in un semplice processo a due fasi da triidrossiacetofenone, disponibile in commercio. Questo percorso comporta

una metilazione diretta del carbonio dell'anello aromatico del triidrossiacetofenone da parte dello iodometano per produrre l'intermedio chiave, il metifloracetafenone.

Hanno inoltre dimostrato che il metifloracetofenone sintetico può essere ossidato dalla perossidasi di rafano e H_2O_2 per produrre acido usnico.

In generale i test farmacologici dei prodotti naturali possono spesso essere ostacolati dalla poca solubilità di tali composti in solventi non tossici. Gli studiosi hanno incontrato tale difficoltà negli studi sugli effetti inibitori dei metaboliti del lichene sulla crescita di cellule di mammifero in coltura.

Il dimetilsolfossido (DMSO) è un solvente comunemente usato, ma si è spesso dimostrato troppo tossico alle concentrazioni richieste per le cellule umane utilizzate negli studi. C'è stata quindi la necessità di trovare un agente più adatto per la solubilizzazione delle sostanze naturali per consentire test su una più grande varietà di linee cellulari *in vitro*. Un tale agente dovrebbe idealmente non avere un effetto diretto né su una qualsiasi delle linee cellulari comunemente utilizzate né sulle cellule di mammifero per consentire un corretto confronto.

Per aumentare la solubilità in acqua di una sostanza insolubile possono essere impiegati diversi metodi: regolazione del pH, uso di un co-solvente, complessanti o tensioattivi. Questi metodi possono essere usati singolarmente o in combinazione.

Altro metodo utilizzato per aumentare la solubilità in acqua è la complessazione con ciclodestrine che sono oligosaccaridi ciclici formate da unità di glucosio legate con legami α 1-4 glucosidico con gruppi ossidrilici sulla superficie esterna e una cavità interna e sono in grado di formare complessi con una grande varietà di molecole idrofobe andando ad aumentarne la solubilità.

In uno studio realizzato da Kristmundsdóttir *et al.* (2002) è stato utilizzato l'acido usnico come prototipo di prodotto insolubile essendo la sua solubilità in acqua inferiore a 10 mg/100 mL a 25°C.

Lo scopo di questo studio era trovare un solvente che fosse in grado di solubilizzare l'acido usnico e che fosse al contempo privo di attività contro una linea cellulare di prova. A tal fine è stata testata una varietà di agenti solubilizzanti farmaceutici noti per la loro capacità di aumentare la solubilità. Nella scelta dei sistemi di solventi da utilizzare negli esperimenti di solubilizzazione l'accento è stato posto sulla loro bassa tossicità, miscibilità con l'acqua e la loro capacità di aumentare la solubilità di molti farmaci non polari.

La solubilizzazione è stata misurata a diversi valori di pH in varie concentrazioni di co-solventi (glicofurolo 75, glicole propilenico, polietilen glicole 400), tensioattivi (polisorbato 20, Cremophor RH40) e l'agente complessante 2-idrossipropil-ciclodestrina.

Gli effetti diretti dei vari sistemi di solventi sono stati testati sulla linea cellulare di leucemia umana K-562 in un test di proliferazione standard.

Il risultato dello studio (Figura 6) mostra l'effetto del pH sulla solubilità dell'acido usnico in soluzione acquosa al 10% di PEG 400, Cremophor RH40 o 2-idrossipropil-ciclodestrina. La solubilità di acido usnico a pH 6 è molto limitata ma è significativo maggiore a pH 8,3.

Nelle soluzioni contenenti PEG 400 e Cremophor RH40 l'aumento della solubilità dell'acido usnico è lineare con l'aumento del pH ma nel caso della 2-idrossipropil ciclodestrina l'aumento della solubilità dell'acido usnico è esponenziale a pH 8,3 rispetto al fisiologico pH 7,4, per questa ragione quest'ultimo è stato scelto per gli esperimenti sulle cellule.

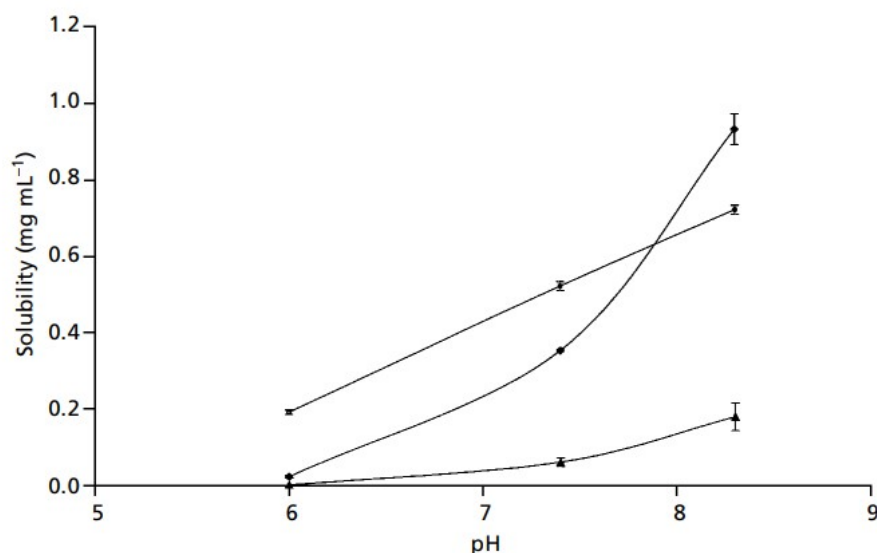


Figura 6. Effetto del pH sulla solubilità dell'acido (+)-usnico in soluzioni acquose al 10% di 2-idrossipropil ciclodestrina (◆), Cremophor RH40 (●) or PEG 400 (▲)

La solubilità è inoltre legata alla concentrazione del solubilizzante a pH 7,4. La solubilità aumenta in funzione della concentrazione del solubilizzante e per 2-idrossipropil-ciclodestrina l'aumento è lineare tra 5 e 20% (Figura 7).

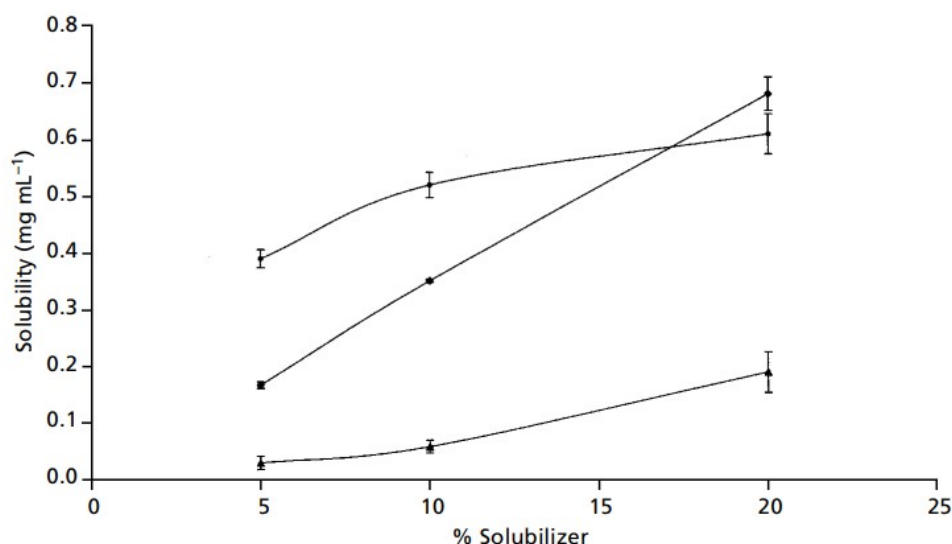


Figura 7. Effetto della concentrazione del solubilizzante sulla solubilità dell'acido (+)-usnico a pH 7.4 in soluzioni di 2-idrossipropil ciclodestrina (◆), Cremophor RH40 (●) o PEG 400 (▲)

Questo studio ha portato all'identificazione di un agente solubilizzante, 2-idrossipropil-ciclodestrina, che è privo di effetti tossici e quindi adatto per l'uso in colture cellulari, e allo stesso tempo capace di portare in soluzione l'acido usnico a concentrazioni che conferiscono un'attività antiproliferativa altamente significativa contro una linea cellulare umana maligna.

Oltre agli studi mirati ad aumentare la solubilità dell'acido usnico, sono stati condotti studi anche al fine di potenziarne l'attività biologica. Lusina *et al.* (2007) hanno studiato la condensazione dell'acido usnico con vari amminoacidi come glicina, β alanina, L- fenilalanina, L-valina, L-leucina, L-metionina e L-serina sulla base della conoscenza che un frammento di amminoacido in una molecola biologicamente attiva può potenziarne l'attività. Inoltre attraverso

tale modificazioni, i nuovi composti acquisiscono un gruppo carbossilico, che estende la gamma delle possibili trasformazioni e può aumentare la solubilità in acqua.

Bazin *et al.* (2008) hanno descritto la sintesi di nove derivati amminici coniugati con l'acido usnico e hanno valutato la loro attività citotossica su linee cellulari di cancro umano e murino. Alla base dello studio c'era il fatto già dimostrato che indirizzare i farmaci antitumorali al sistema di trasporto delle poliammine (PTS) potesse migliorare la loro attività. Inoltre a causa dell'ampia tolleranza del PTS e della sua alta attività nelle cellule cancerose in rapida divisione, la vettorizzazione di un agente chemioterapico attraverso una catena poliamminica naturale o sintetica può migliorare la sua veicolazione nelle cellule tumorali e di conseguenza la sua attività e selettività. Studi dettagliati hanno evidenziato i requisiti strutturali dei coniugati con poliammina con target il PTS in leucemia murina (L1210) e cellule ovariche di criceto cinese (CHO).

Nello studio è stato impiegato l'acido (+)-usnico in quanto disponibile in commercio. La citotossicità dei derivati amminici contro una varietà cellulare murina e le linee cellulari tumorali umane sono state valutate utilizzando il saggio MTT.

L'introduzione di una catena laterale poliamminoalchilica o di un amminoacido sull'acido usnico ha fortemente influenzato la sua citotossicità e questi composti derivati hanno mostrato una migliore attività verso tutti i tumori delle linee cellulari studiate rispetto all'acido usnico. I derivati poliamminici erano più attivi sulle cellule L1210 rispetto a (+)-acido usnico.

L'incremento di citotossicità non è dato dalla somma delle singole citotossicità dei due componenti. Infatti, le poliammine libere hanno una citotossicità nulla o molto bassa e la co-somministrazione di (+)-acido usnico libero e poliammine non ha evidenziato lo stesso risultato. Queste osservazioni dimostrano che la migliore citotossicità dei coniugati poliammino-acido usnico è una caratteristica intrinseca di queste molecole.

Gli autori hanno poi dimostrato che entrambi gli isomeri dell'acido usnico (-) e (+) inducevano l'apoptosi delle cellule L1210. Hanno quindi confrontato l'attività apoptotica di (+)-acido usnico e del suo derivato più attivo diamminoottano sulle cellule L1210. Per ogni composto sono state saggiate due concentrazioni. Entrambi i composti hanno mostrato un effetto dose-dipendente e un'induzione dell'apoptosi dipendente dal tempo in L1210.

In questo studio, è stato quindi dimostrato che l'attività citotossica dell'acido usnico contro le linee cellulari cancerose può essere migliorata dalla sua coniugazione con una catena di poliammine. Pertanto, i composti coniugati hanno mostrato una migliore attività verso tutte le linee cellulari tumorali studiate rispetto all'acido (+)-usnico.

Tuttavia, il targeting al PTS non ha avuto successo: nessuno dei coniugati con poliammine naturali ha mostrato un'attività preferenziale in una linea cellulare con un'elevata attività PTS. Questo può essere dovuto a una struttura sfavorevole dei coniugati.

Molto valida si è dimostrata invece la coniugazione dell'acido usnico al diamminoottano che ha generato il composto più efficiente in termini di citotossicità che è da 3 a 18 volte più attivo dell'acido (+)-usnico sulle linee cellulari tumorali studiate.

Nonostante molti studi incentrati sulla caratterizzazione fisico-chimica, sono stati riportati metodi analitici diversi che descrivono l'identificazione, la separazione e la quantificazione di acido usnico negli estratti di licheni, nel plasma, nei preparati farmaceutici.

In uno studio realizzato da Cansaran *et al.* (2006) sono state esaminate alcune specie di licheni raccolte da diverse aree dell'Anatolia (Turchia) e indagate le attività antibatteriche degli estratti

acetonicici di *Usnea florida*, *Usnea barbata*, *Usnea longissima*, *Usnea rigida*, *Usnea hirta* e *Usnea subflorida*.

L'acido usnico negli estratti in acetone è stato quantificato tramite HPLC. Questo è il primo studio con tecniche HPLC sul genere *Usnea* e si è concentrato sulla rilevazione dell'attività antimicrobica e sulla definizione della quantità di acido usnico delle sei specie utilizzate nello studio.

In questo studio è stata testata l'attività antimicrobica dell'estratto acetonicico di *Usnea florida*, *U. barbata*, *U. longissima*, *U. rigida*, *U. hirta* e *U. subflorida* contro sette batteri di prova. Lo studio ha indicato che con l'aumento della quantità di acido usnico si è assistito anche a un aumento dell'effetto antimicrobico degli estratti di lichene contro i batteri testati. Gli estratti acetonicici di *U. subflorida*, *U. florida* e *U. barbata* si sono rivelati efficaci sulla maggior parte dei batteri testati. L'estratto di *U. subflorida*, che è il più efficiente, ha mostrato il più alto effetto di inibizione su *Bacillus subtilis* e *Bacillus megaterium* e inoltre questo estratto ha anche inibito la crescita di batteri Gram-negativi come *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis*.

Quando le zone di inibizione ottenute da *U. subflorida* sono stati confrontati con quello di un antibiotico standard, è stato determinato che *E. coli* e *P. mirabilis* erano più suscettibili all'estratto di lichene e questi batteri Gram-negativi sono risultati essere meno suscettibili agli estratti acetonicici ottenuti da altre specie *Usnea* rispetto a *Usnea subflorida*.

B. subtilis e *B. megaterium*, batteri Gram-positivi, sembravano invece essere suscettibili agli estratti in acetone di tutte le specie di *Usnea* considerate nello studio (Tabella 1).

Tabella 1. Attività antimicrobica degli estratti di lichene

	Mean (average) inhibition zone [mm] ^a						Tet ^b
	<i>Usnea subflorida</i>	<i>Usnea florida</i>	<i>Usnea barbata</i>	<i>Usnea longissima</i>	<i>Usnea hirta</i>	<i>Usnea rigida</i>	
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 35218)	18 ± 0.01	-	-	-	-	-	12
<i>Enterococcus faecalis</i> (RSKK 508)	-	-	-	-	-	-	30
<i>Proteus mirabilis</i> (Pasteur Ens. 235)	20 ± 0.01	-	-	-	-	-	8
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-	40
<i>Bacillus subtilis</i>	30 ± 0.01	21 ± 0.01	20 ± 0.01	15 ± 0.02	14 ± 0.01	12 ± 0.01	26
<i>Bacillus megaterium</i>	31 ± 0.01	22 ± 0.01	22 ± 0.02	17 ± 0.02	11 ± 0.01	10 ± 0.01	20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	20

^a Includes diameter of disc (6 mm). ^b Tet, tetracycline. (-), no inhibition.

Inoltre, è stata determinata quantitativamente la sostanza attiva acido usnico negli estratti acetonicici di *U. florida*, *U. barbata*, *U. longissima*, *U. rigida*, *U. hirta* e *U. subflorida* attraverso HPLC. L'identificazione dei picchi nei cromatogrammi degli estratti di licheni è stata ottenuta confrontando i loro tempi di ritenzione con quelli di acido usnico standard (Tabella 2).

Il risultato più interessante nonché la quantità più alta di acido usnico è stata rilevata nel campione di *Usnea subflorida*, nel quale il 6,49% del peso secco del lichene era costituito proprio da questo metabolita.

Tabella 2. Quantità e tempi di ritenzione di acido usnico negli estratti acetonicici

Species	% of usnic acid in dry weight	Retention time [min]
<i>Usnea subflorida</i>	6.49 ± 0.01	11.4
<i>Usnea florida</i>	2.36 ± 0.37	13.9
<i>Usnea barbata</i>	2.16 ± 0.67	13.8
<i>Usnea longissima</i>	1.12 ± 0.11	12.2
<i>Usnea hirta</i>	0.68 ± 0.04	13.1
<i>Usnea rigida</i>	0.22 ± 0.01	11.5

Sono stati sviluppati diversi metodi analitici per la determinazione dell'acido usnico, tra i quali spettrofotometria, fluorimetria, cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC), cromatografia su strato sottile (TLC), elettroforesi capillare a zona.

CAPITOLO 2

PROPRIETÀ BIOLOGICHE

Sono state attribuite varie attività all'acido usnico anche se quella antimicrobica resta la principale, vista la sua capacità contro ceppi resistenti agli antibiotici tradizionali, ma nel corso degli anni si è parlato sempre di più anche delle sue proprietà antimicotiche, antivirali, antiparassitarie, antitumorali, gastroprotettive, antinfiammatorie, antiossidanti.

ATTIVITÀ ANTIMICOTICHE

L'attività antimicotica dell'acido usnico è stata scoperta negli anni Cinquanta quando è stata osservata l'inibizione del fungo *Trycophyton mentagrophytes*.

Successivamente, visto il basso numero di farmaci disponibili per i trattamenti fungini è stata incoraggiata la ricerca di nuovi agenti antimicotici e sono stati condotti più studi con UA contro diversi funghi (muffe o lieviti).

Guo *et al.* (2017) hanno testato l'efficacia dell'acido usnico e degli estratti acetonicici di tre licheni (*Cladonia amaurocraea*, *Cladonia rangiferina* e *Usnea longissima*) sul controllo della crescita di *Saprolegnia parasitica*, *Achyla bisexualis* e *Pythium* spp., tre funghi oomiceti patogeni in grado di causare gravi saprolegnosi nei pesci.

Secondo gli autori la MIC di acido usnico per i funghi testati *S. parasitica* e *A. bisexualis* era di 2 mg/L e per *Pythium* spp. era 8 mg/L, inoltre l'acido usnico ha inibito completamente la crescita di *S. parasitica* a 32 mg/L. Fra tutti e tre i funghi oomiceti la crescita di *S. parasitica* è stata inibita oltre il 50% a concentrazioni di acido usnico superiori al 4 mg/L. Per quanto riguarda i tre estratti di licheni, a concentrazioni superiori a 200 mg/L, hanno inibito oltre il 50% della crescita di *S. parasitica* mentre la crescita degli altri funghi è stata inibita con almeno 1600 mg/L di estratto.

Recentemente, Kumar *et al.* (2019), utilizzando la candidosi e modelli di dermatofitosi, hanno evidenziato l'attività antimicotica della nanoemulsione di olio di cannella e UA.

ATTIVITÀ ANTIBATTERICA

Enterococchi resistenti alla vancomicina (VRE) e stafilococchi resistenti alla meticillina, in particolare *Staphylococcus aureus* meticillina resistente (MRSA), causano gravi problemi clinici in tutto il mondo.

L'arsenale di antibiotici disponibile contro questi ceppi è limitato, l'arrivo di nuovi mutanti resistenti peggiora la situazione ed è ormai noto come questo problema sia diventato particolarmente rivelante. Si è quindi rivelata estremamente importante la ricerca di nuovi farmaci attivi contro VRE e MRSA.

Elo *et al.* (2007) hanno condotto uno studio sugli effetti dell'acido (+)-usnico e dell'acido (+)-usnico sale sodico diidrato (usnato di sodio) contro isolati clinici di VRE (sia *Enterococcus faecalis* che *Enterococcus faecium*) e MRSA.

Tutti gli isolati erano originariamente ottenuti da ospedali finlandesi e per tutti i Ceppi VRE utilizzati, il genotipo B (sei ceppi) o il genotipo A (un ceppo) era stato confermato dal National

Public Health Institute of Finland, dove erano state confermate anche le caratteristiche dei ceppi di MRSA.

A tutte le concentrazioni testate il sodio usnato ha inibito notevolmente la crescita di tutti i ceppi VRE studiati, i ceppi di *E. faecalis* apparentemente sono risultati leggermente più sensibili rispetto ai ceppi di *E. faecium* sebbene le differenze fossero piccole (Tabella 3).

L'acido libero aveva anch'esso una attività antibatterica, ma inferiore rispetto all'usnato di sodio, questo anche a causa della sua quasi totale insolubilità in dimetil solfossido, solvente utilizzato nello studio.

Entrambe le sostanze hanno inibito anche la crescita di tutti i ceppi di MRSA testati anche se in misura nettamente inferiore a quella dei ceppi VRE.

Tabella 3. Attività antibatterica di acido (+)-usnico e usnato di sodio contro isolati clinici di VRE e MRSA

Organism group (no. tested)	Inhibitory zone (mm)					
	Usnic acid			Sodium usnate		
	Concentration (mg/ml) ^a			Concentration (mg/ml) ^a		
	10	20	40	10	20	40
VRE (7)						
<i>E. faecium</i> (4)	19–20 ^b	18–21 ^b	18–23	24–28 ^b	27–29 ^b	25–32
<i>E. faecalis</i> (3)	22–23	23	23	30–31	29–30	31–32
MRSA (3)						
	ND	ND	13–16	ND	ND	21–23

ND Not determined

^a Concentration of test substance in the DMSO solution or suspension, 10 µl of which were pipetted on each filter paper disk

^b Based on measurements with three strains only

L'attività anti-VRE dell'usnato di sodio è stata testata andando a verificarne la Minima Concentrazione Inibente (MIC) (Tabella 4). Tutti i ceppi erano sensibili al farmaco, i valori di MIC variavano tra 4 e 16 µg/mL (dopo un giorno) e tra 4 e 31 µg/mL (dopo due giorni) e si sono attestati sotto a 8 µg/mL per la maggior parte dei ceppi. Questi risultati indicano un'elevata attività antimicrobica dell'usnato di sodio ancora più evidente se confrontata con il sale sodico dell'ampicillina.

Inoltre, rispetto al sale sodico dell'ampicillina, sodio usnato ha mostrato variazioni interceppo molto più piccole dei valori MIC, avendo una potente attività anche contro quei ceppi che non erano stati inibiti dalle concentrazioni più alte testate (125 µg/mL) del sale sodico dell'ampicillina a 48 h, e nella maggior parte dei casi, il suo valore MIC non aumentava dal giorno 1 al giorno 2; sodio usnato inoltre non ha mai perso la sua attività dopo il giorno 1, in contrasto con il sale sodico dell'ampicillina che nella maggior parte dei casi perdeva la sua attività contro il ceppo *E. faecium* VRE.

Hanno quindi confermato che nel caso di ceppi di *E. faecium* VRE, l'attività di sodio usnato era notevolmente superiore a quello del sale sodico di ampicillina.

Tabella 4. Risultati dei tests MIC.

Bacterial species ^a	MIC of sodium usnate (µg/ml)		MIC of the sodium salt of ampicillin (µg/ml)	
	1 day	2 day	1 day	2 day
<i>E. faecalis</i> , strain a	7.8	7.8	2.0	3.9
<i>E. faecalis</i> , strain b	7.8	7.8	2.0	2.0–3.9
<i>E. faecalis</i> , strain c	16	31	2.0	3.9
<i>E. faecium</i> , strain a	7.8	7.8	63	>125 ^b
<i>E. faecium</i> , strain b	7.8	7.8	63	125
<i>E. faecium</i> , strain c	3.9	7.8	125	>125 ^b
<i>E. faecium</i> , strain d (van A)	3.9	3.9	63	>125 ^b

^a All strains had the van B genotype if not otherwise noted.

^b 125 µg/ml The highest concentration tested

Un altro tipo di studio è stato condotto nel 2004 da Francolini *et al.* Punto di partenza di questo studio era stata la consapevolezza che i microrganismi potessero colonizzare un'ampia varietà di dispositivi medici, mettendo i pazienti a rischio di infezioni locali e sistemiche, comprese infezioni nel sito di impianto.

I Centri per il controllo e la prevenzione delle malattie hanno stimato che ogni anno si verificano circa 80.000 infezioni del flusso sanguigno associate a catetere venoso centrale nelle unità di terapia intensiva negli Stati Uniti e, a tal proposito, recenti studi hanno dimostrato che un'ampia gamma di infezioni persistenti correlate al catetere possono essere collegate alla capacità di batteri e funghi infettivi di formare biofilm.

Il trattamento delle infezioni correlate al dispositivo tramite agenti antimicrobici convenzionali spesso fallisce perché i microrganismi che crescono nei biofilm sono molto più resistenti agli agenti antimicrobici rispetto alle cellule planctoniche.

Nell'ultimo decennio, sono state suggerite diverse strategie per inibire la crescita di batteri sui dispositivi medici, tra cui l'uso di unguenti antimicrobici topici e la riduzione al minimo del tempo di cateterizzazione.

L'ipotesi degli autori era che l'acido usnico potesse rivelarsi utile nel controllo dei biofilm formati da patogeni umani Gram-positivi grazie alla sua capacità di prevenire l'invasione da parte di agenti patogeni nei licheni.

In questo studio i ricercatori hanno caricato i polimeri con acido (+)-usnico e hanno confrontato gli effetti sul biofilm con una superficie di controllo.

La capacità dell'acido (+)- usnico nel controllare la crescita di biofilm è stata osservata usando *Staphylococcus aureus* e il patogeno Gram-negativo *Pseudomonas aeruginosa*.

L'influenza sull'adesione iniziale è stata valutata dopo periodi di esposizione di 30 minuti o 24 ore. Effetti a lungo termine sulla crescita sono stati valutati dopo 3 giorni. Sono stati riscontrati risultati diversi tra i due patogeni. Per quanto riguarda *P. aeruginosa*, l'area della superficie ricoperta dal biofilm è aumentata significativamente dopo 72 h (Figura 8): la superficie coperta ha raggiunto il 54,6% ± 2,7% sulla superficie del polimero di controllo e 28,8% ± 3,3% sulla superficie del polimero trattato.

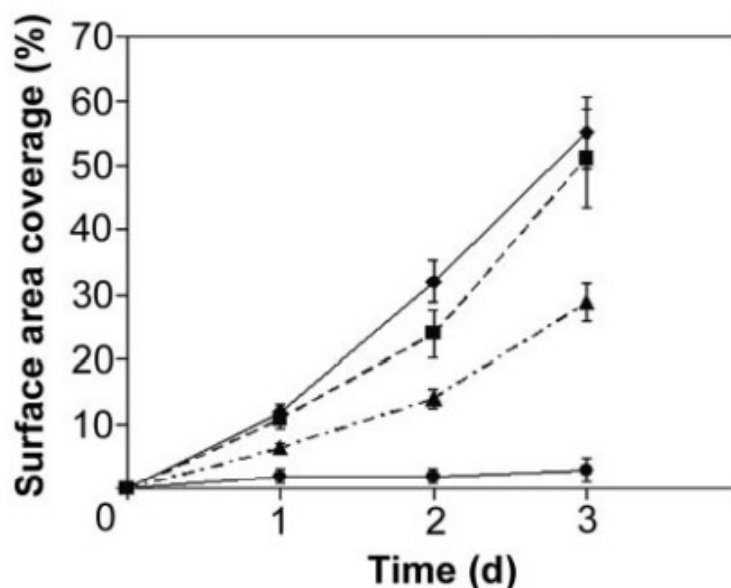


Figura 8. Area di superficie coperta dal biofilm dopo 3 giorni.
Crescita di *P. aeruginosa* sul controllo (♦) e sul polimero trattato con acido (+)-usnico (▲).
Crescita di *S. aureus* sul polimero di controllo (■) e sul polimero trattato (●)

Sempre per *P. aeruginosa* non sono state invece osservati significative differenze nelle concentrazioni di cellule, che sono state $8.9 \pm 0.8 \log_{10} \text{CFU/cm}^2$ per il polimero di controllo e $8.1 \pm 0.8 \log_{10} \text{CFU/cm}^2$ per il polimero trattato con acido usnico (Figura 9).

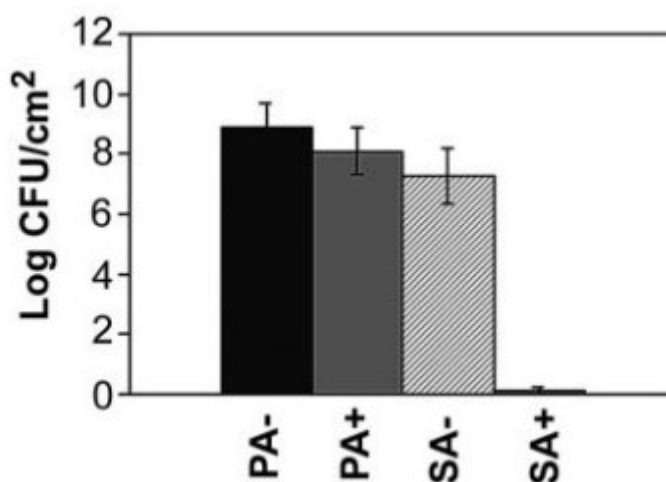


Figura 9. Concentrazione cellulare sulla superficie del biofilm di *P. aeruginosa* (PA) e *S. aureus* (SA) sul polimero di controllo (-) e sul polimero trattato (+)

L'acido usnico ha dimostrato avere una influenza sulla morfologia del biofilm, sullo spessore e sulla densità. Sul polimero di controllo, *P. aeruginosa* ha formato un biofilm piatto con uno spessore di $14,53 \mu\text{m}$, mentre nel polimero trattato il biofilm ha formato una struttura costituita da micro-colonie a forma di tumulo separate da aree vuote. A causa di questa diversa morfologia, il biofilm sul polimero trattato era significativamente più spesso rispetto a quello presente sul polimero di controllo con uno spessore medio di $26,61 \mu\text{m}$ (Figura 10).

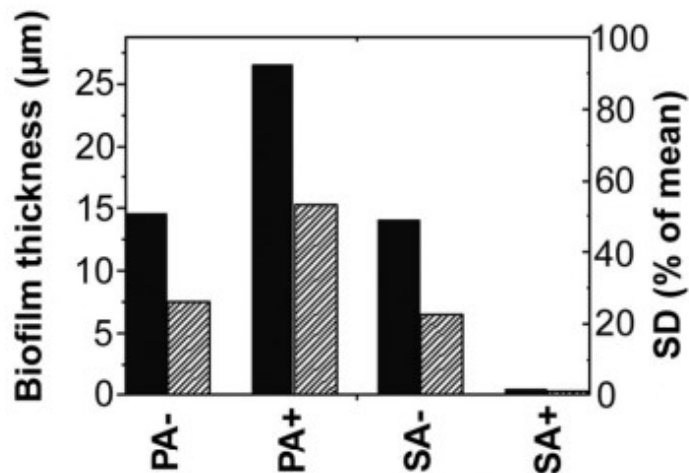


Figura 10. Spessore medio del biofilm (colonne nere) e deviazione standard (colonne grigie) per *P. aeruginosa* (PA) e *S. aureus* (SA) sul polimero di controllo (-) e sul polimero trattato con acido usnico (+)

Molto chiara è risultata l'inibizione da parte dell'acido (+)-usnico sulla formazione di biofilm da parte di *S. aureus*. La concentrazione cellulare di biofilm sul polimero non trattato era $7,3 \pm 0,9 \log_{10} \text{CFU/cm}^2$ rispetto a $0,9 \pm 0,1 \log_{10} \text{CFU/cm}^2$ sul polimero contenente acido (+)-usnico (Figura 9).

Tre giorni dopo l'inoculazione *S. aureus* ha formato un biofilm sulla superficie di controllo, non è invece stata osservata una significativa crescita sul polimero caricato da acido usnico.

Poiché l'accumulo di biofilm di *S. aureus* è stato quasi completamente inibito dalla presenza di acido (+)-usnico nel polimero, gli autori hanno voluto caricare il polimero trattato con acido (+)-usnico una seconda volta. L'analisi ha dimostrato nuovamente che la crescita del biofilm di *S. aureus* era inibita per il secondo periodo di crescita di 3 giorni, confermando la capacità dell'acido (+)-usnico di inibire la crescita del biofilm.

Al contrario, i biofilm di *P. aeruginosa* si sono formati sulle superfici sia del controllo che del polimero trattato con acido (+)-usnico. Considerando il periodo di crescita di 3 giorni, non c'erano state differenze statisticamente significative nelle concentrazioni di cellule del biofilm presenti nei due polimeri.

Gli autori sono quindi giunti alla conclusione che l'acido (+)-usnico può essere utilizzato nello sviluppo di cateteri antimicrobici per resistere alla formazione di biofilm da parte di *S. aureus* e probabilmente anche altri organismi Gram-positivi, questo quindi apre alla possibilità dell'utilizzo di materiali modificati con acido (+)-usnico per la costruzione di cateteri resistenti alla crescita di biofilm, in particolare cateteri intravascolari, data la sua specificità d'azione contro i ceppi batterici Gram-positivi.

ATTIVITÀ ANTIVIRALE

La prima attività antivirale dell'acido usnico è stata documentata nel 1995 da Yamamoto *et al.* che hanno testato entrambe le forme enantiomeriche di UA contro il virus di Epstein-Barr e hanno dimostrato che la forma destrogira presentava un'attività antivirale maggiore rispetto al suo enantiomero levogiro.

Campanella *et al.* (2002), hanno studiato l'effetto dell'acido usnico sulla proliferazione del poliomavirus del topo in cellule 3T6. I risultati hanno mostrato che la replicazione del DNA del poliomavirus era gravemente inibita a una concentrazione non citotossica di UA. Secondo gli autori, UA agisce come un repressore generico della trascrizione dell'RNA.

Gli studi successivi si sono concentrati sulla attività antivirale di UA contro un'infezione respiratoria diffusa: l'influenza. Nonostante il successo di vaccinazione e misure di prevenzione dell'influenza, questa infezione rimane difficile da controllare a causa dell'elevata variabilità genetica del virus e delle varie complicanze a lungo termine conseguenti alla fase acuta.

A differenza della RNA-polimerasi eucariotica, il complesso della polimerasi virale non ha un meccanismo di correzione degli errori. Per questo motivo il virus dell'influenza dimostra un tasso molto alto di mutazioni che lo rendono in grado di eludere la risposta immunitaria adattativa e portano alla rapida selezione di ceppi farmaco-resistenti.

Due classi principali di composti sono usate per il trattamento dell'influenza e differiscono per i loro bersagli virali e il meccanismo d'azione. Amantadina e rimantadina bloccano la proteina M2 virale, necessaria per il rilascio dell'RNA virale nelle cellule infette e gli inibitori della neuraminidasi (zanamivir, oseltamivir, peramivir e laninamivir) interferiscono con l'attività della neuraminidasi virale, che svolge un ruolo essenziale nel rilascio di particelle di virus dalla cellula ospite. Nonostante i vantaggi evidenti, i derivati dell'adamantano inibiscono il virus dell'influenza di tipo A ma non di tipo B. Gli inibitori della neuraminidasi sono costosi e sono già stati scoperti ceppi resistenti ai farmaci, in particolare per i virus altamente patogeni del sottotipo H5N1 e sottotipo stagionale H1N1.

Da qui la necessità di puntare alla ricerca e all'ulteriore sviluppo di nuovi potenti antivirali contro l'influenza, che abbiano un ampio spettro di azione, attività e meccanismi d'azione alternativi. Composti naturali, compresi i metaboliti secondari dei licheni, sono una promettente fonte di nuovi composti antivirali.

In uno studio condotto da Sokolov *et al.* (2009) è stata studiata per la prima volta l'attività antivirale dell'acido usnico e dei suoi derivati contro il virus dell'influenza pandemica A (H1N1) usando cellule MDCK e i risultati hanno evidenziato che queste molecole sono sostanze antinfluenzali.

Shtro *et al.* (2015) hanno dimostrato l'attività antivirale di alcuni derivati sintetici di acido usnico contro il virus influenzale *in vitro* (valutato in base alla loro capacità di diminuire il titolo del virus in cellule renali canine Madin-Darby) e *in vivo* (valutato per diminuzione di mortalità dei topi). Un composto, valina enammina-UA, ha ridotto notevolmente la letalità negli animali infetti e non ha dato origine alla comparsa di ceppi resistenti. Ulteriori studi hanno mostrato che l'epatotossicità di questo composto era ridotta rispetto all'UA naturale, evidenziando che potrebbe essere un potenziale candidato per lo sviluppo di una nuova terapia antinfluenzale.

ATTIVITÀ ANTIPARASSITARIA

Un'altra attività attribuita all'UA sono le sue proprietà antiparassitarie. Il primo rapporto incentrato in questo campo è stato descritto da Wu *et al.* (1995), quando hanno messo in evidenza *in vitro* l'attività dell'acido usnico contro *Trichomonas vaginalis*.

L'acido usnico isolato dal lichene cileno *Protousnea malacea* è stato testato contro la forma promastigote di tre ceppi di *Leishmania*: *L. braziliensis*, *L. amazonenses* e *L. donovani*.

In questo studio, UA ha promosso la lisi totale dei tre ceppi in saggi *in vitro*, oltre a mostrare una significativa riduzione della lesione cutanea nei topi infetti da *L. amazonenses*, dimostrandone l'interessante attività antiparassitaria (Fournet *et al.* 1997).

Inoltre, l'attività leishmanicida di UA è stata recentemente dimostrata da Derici *et al.* (2018) contro *Leishmania major*, *Leishmania infantum* e *Leishmania tropica* nella loro forma promastigote.

L'acido usnico ha ridotto la vitalità dei tre parassiti a diversi livelli in modo dose-dipendente rispetto ai controlli che non hanno avuto effetto. L'IC₅₀ di UA era rispettivamente 10,76 µg/mL, 13,34 µg/mL e 21,06 µg/mL (Figura 11).

Gli autori hanno valutato il meccanismo apoptotico della *Leishmania* causata da UA e hanno concluso che promuoveva aumento dell'espressione genica di p53, Bax, Casp-3 e Casp-9, riducendo così la proliferazione cellulare delle forme promastigote.

È stato interessante per gli studiosi osservare che la vitalità di *L. major* è stata completamente persa dopo 48 ore di incubazione con 100 µM di acido usnico.

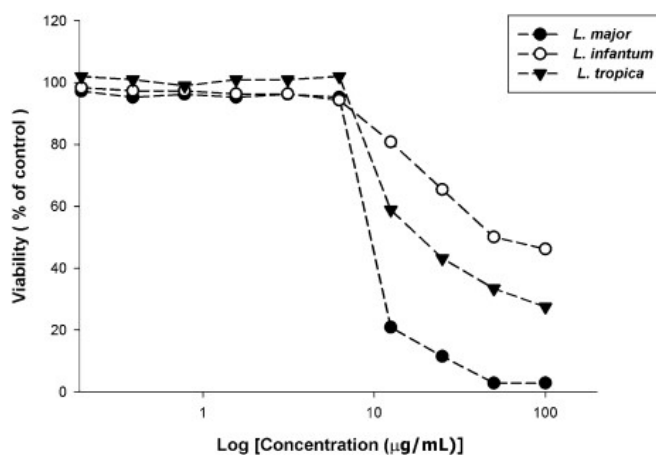


Figura 11. Confronto degli effetti delle concentrazioni di acido usnico sulla sopravvivenza delle specie di *Leishmania* con un controllo. I risultati dei valori di IC₅₀ erano 10.76 µg/mL, 13.34 µg/mL e 21.06 µg/mL per *L. major*, *L. tropica* e *L. infantum* rispettivamente.

Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato e i dati espressi sono la media dei valori.

Susmann *et al.* (2011) stimolato dalla resistenza dei parassiti ai farmaci convenzionali, ha testato l'acido usnico contro *Plasmodium falciparum* e ha scoperto che ha un'importante azione contro il parassita in quanto inibitore reversibile della biosintesi della vitamina E, necessaria per lo sviluppo del parassita.

L'attività *in vitro* del sale UA-potassico contro *Schistosoma mansoni* è stato studiato da Araujo *et al.* (2019), il quale ha eseguito un'analisi ultrastrutturale che ha evidenziato che il sale UA-potassico potrebbe essere utilizzato per lo sviluppo di nuovi agenti schistosomicidi.

ATTIVITÀ ANTITUMORALE

Molti farmaci per il trattamento del cancro sono ottenuti da fonti naturali. Esempi includono il taxolo (Paclitaxel), un diterpene isolato da *Taxus brevifolia*, e vincristina e vinblastina, alcaloidi estratti da *Catharanthus roseus*. Anche i licheni e in particolare il loro metabolita acido usnico si sono rivelati avere rilevanti proprietà anche in questo ambito.

L'attività antitumorale dell'acido usnico è stata descritta per la prima volta nel carcinoma polmonare di Lewis da Kupchan e Kopperman (1975), si sono poi susseguiti una serie di studi che hanno rivelato l'attività dell'acido usnico verso molte linee cellulari cancerose.

In uno studio condotto da Brisdelli *et al.* (2013) l'acido usnico è stato messo a confronto con altri metaboliti isolati da licheni antartici (acido diffractaico, acido lobarico, vicanicina, acido variolarico, acido protolichesterinico), con lo scopo di indagare la loro attività antiproliferativa verso le linee cellulari umane MCF-7 (adenocarcinoma mammario), HeLa (cervice adenocarcinoma) e HCT-116 (carcinoma del colon).

Per verificare l'effetto dei metaboliti del lichene in esame (Tabella 5) sulla crescita e sulla sopravvivenza cellulare, le cellule MCF-7, HeLa e HCT-116 sono state esposte a concentrazioni crescenti, da 2,5 a 100 μM , di acido diffractaico, acido lobarico, acido usnico, vicanicina, acido variolarico, acido protolichesterinico ed etoposide come controllo positivo per 48 h. Quindi, la sopravvivenza cellulare rispetto ai controlli non trattati è stata valutata utilizzando il saggio MTT.

Tabella 5. Composti studiati per l'attività citotossica, le specie di lichene e la origine geografica

Compound	Species	Chilean geographic origin
Diffractaic acid	<i>Protousnea magellanica</i> (Mont.) Krog	Laguna Icalma, Region de La Araucanía
Vicanicin	<i>Psoroma pallidum</i> Nyl., <i>P. pulchrum</i> Malme	Southern of Chile (Villarrica), Region de La Araucanía
Lobaric acid	<i>Stereocaulon alpinum</i> Laurer ex Funck	Ardley Cove, King George Island, Shetland del Sur, Antarctica
Variolaric acid	<i>Ochrolechia deceptionis</i> (Hue) Darb.	King George Island, near Teniente Marsh Base, Shetland del Sur, Antarctica
Protolichesterinic acid	<i>Cornicularia aculeata</i> (Schreb.) Ach.	Ardley Cove, King George Island, Shetland del Sur, Antarctica
Usnic acid	<i>Cladonia lepidophora</i> Ahti & Kashiw	Robert Island, Shetland del Sur, Antarctica

La sopravvivenza cellulare di tutte le linee cellulari non è stata influenzata dalla presenza di acido variolarico. Tra le linee cellulari testate, è stato osservato un comportamento diverso dell'effetto citotossico dei metaboliti; è stata riscontrata una maggiore suscettibilità nella proliferazione delle cellule HCT-116, mentre le cellule MCF-7 erano meno sensibili all'azione dei composti lichenici.

Per la maggior parte dei metaboliti, è stata osservata solo una lieve citotossicità nelle cellule HeLa e HCT-116 esposte a concentrazione di 2,5-10 μM , mentre una evidente attività antiproliferativa è stata rilevata in cellule trattate con concentrazioni nell'intervallo 25-100 μM .

La vicanicina ha indotto una significativa perdita di vitalità in modo dose-dipendente nelle cellule HeLa e HCT-116 con valori IC50 di 67 μ M e 40,5 μ M, rispettivamente, ma non ha mostrato alcun effetto citotossico sulle cellule MCF-7. L'acido diffractaico ha mostrato una buona attività antiproliferativa contro le cellule HCT-116 da 25 μ M, con valore IC50 di 42,2 μ M, mentre una riduzione di vitalità nelle cellule MCF-7 e HeLa è stata osservata a concentrazioni superiori a 50 μ M. L'acido lobarico ha mostrato attività alle concentrazioni più elevate solo su HeLa e cellule HCT-116.

Un effetto citotossico più forte è stato indotto da acidi protolichesterinici e usnici. Nelle tre linee cellulari, la sopravvivenza cellulare è diminuita significativamente dopo il trattamento con concentrazioni più elevate di questi metaboliti del lichene superiore a 25 μ M. Per determinare il grado di tossicità di questi composti verso le cellule normali, sono stati condotti esperimenti nelle stesse condizioni sperimentali anche in NIH-3T3 (linea cellulare embrionale di fibroblasti di topo). Tutti i metaboliti considerati nello studio (eccetto acido variolarico) hanno indotto una lieve citotossicità nella linea cellulare normale con valori di IC50 più alti rispetto ai valori di IC50 riferiti alle linee cellulari cancerose (Tabella 6).

Tabella 6. Attività citotossica *in vitro* dei metaboliti del lichene.

Compound	HCT-116	HeLa	MCF-7	NIH-3T3
Diffractaic acid	42.2 \pm 10.4	64.6 \pm 6.4	93.4 \pm 2.3	> 100
Vicanicin	40.5 \pm 19.1	67.0 \pm 3.1	> 100	> 100
Variolaric acid	> 100	> 100	> 100	> 100
Lobaric acid	93.2 \pm 0.2	78.0 \pm 7.1	> 100	> 100
Protolichesterinic acid	34.3 \pm 2.5	46.7 \pm 4.7	> 100	78.5 \pm 3.3
Usnic acid	17.7 \pm 5.4	23.7 \pm 2.5	75.7 \pm 3.4	> 100
Etoposide	40.3 \pm 4.2	45.2 \pm 5.2	67.6 \pm 3.1	2.3 \pm 4.0

I valori di IC50 (concentrazione del composto che inibisce la crescita cellulare del 50%) sono espressi in μ M.

I risultati fanno riferimento alla media \pm SD di tre esperimenti

I risultati di questo studio indicano che, con l'eccezione di acido variolarico che non ha inibito la proliferazione di una qualsiasi delle tre linee cellulari utilizzate, i metaboliti dei licheni testati (Tabella 5) hanno mostrato vari effetti citotossici in modo dipendente dalla concentrazione e nello studio in questione, l'acido usnico si è dimostrato essere l'agente citotossico più potente in tutte le linee cellulari tumorali analizzate.

Confermando l'attività antitumorale di UA, Brandaño *et al.* (2013) hanno dimostrato che l'acido usnico mostrava citotossicità sulla linea cellulare di melanoma UACC-62.

In uno studio realizzato da Einarsdóttir *et al.* (2010) sono state messe a confronto le proprietà antitumorali dei due enantiomeri verso la linea cellulare di cancro alla mammella T-47D e la linea cellulare di cancro al pancreas Capan-2. È stato dimostrato che l'acido (+)-usnico puro di *Cladonia arbuscula* e l'acido (-)-usnico di *Alectoria ochroleuca* sono inibitori ugualmente efficaci della sintesi del DNA, con IC50 4.2 μ g/mL e 4.0 μ g/mL per rispettivamente (+) e (-) -acido usnico contro T-47D e 5,3 μ g/mL e 5,0 μ g/mL contro Capan-2.

L'analisi citofluorimetrica ha confermato l'inibizione dell'ingresso nella fase S e ha mostrato una riduzione delle dimensioni delle cellule. La necrosi, misurata dal rilascio di LDH, è stata osservata solo in Capan-2 dopo esposizione per 48 ore.

In conclusione, l'acido usnico ha avuto un marcato effetto inibitorio sulla crescita e la proliferazione di due diverse linee cellulari di cancro umano e ha portato alla perdita del potenziale della membrana mitocondriale e nessuna differenza è stata notata tra i due enantiomeri.

ALTRE ATTIVITÀ

Oltre alle attività fino a qui illustrate, molti autori hanno evidenziato altre importanti proprietà biologiche delle quale si pregia l'acido usnico in particolare l'attività gastroprotettiva, antiinfiammatoria e antiossidante.

GASTROPROTETTIVA

In uno studio condotto da Odabasoglu *et al.* (2006), l'acido usnico isolato da *Usnea longissima* è stato testato nel trattamento dell'ulcera gastrica indotta da indometacina nei ratti. Le lesioni gastriche sono state ridotte alle dosi testate (25, 50, 100 e 200 mg/kg peso), rispetto al farmaco di riferimento ranitidina (25 mg/kg di peso corporeo).

CICATRIZZANTE, ANTIOSSIDANTE E ANTINFIAMMATORIA

La riparazione tissutale alterata è una preoccupazione significativa in molte condizioni (post-operatorie, ustioni, cicatrici). È quindi di grande interesse la ricerca di nuove entità chimiche da utilizzare come agenti cicatrizzanti (da soli o in formulazioni con altri farmaci) per il trattamento cronico di ferite, ustioni, lesioni vaginali e infezioni della bocca.

La guarigione delle ferite è un processo complesso che può essere suddiviso in tre fasi: infiammazione, proliferazione e rimodellamento. Queste fasi coinvolgono alcune attività cellulari coordinate, come migrazione verso l'area ferita, proliferazione, deposizione e rimodellamento della matrice extracellulare, in particolare il reticolo di collagene.

Molti prodotti naturali sono anche noti per possedere proprietà curative delle ferite e c'è un grande interesse per trovare nuove entità chimiche che potrebbero condividere proprietà antibiotiche, antiinfiammatorie e di rimodellamento cellulare e di caratterizzare il loro meccanismo d'azione.

In uno studio condotto da Bruno *et al.* (2013) è stata valutata la capacità di guarigione delle ferite dei derivati enaminici dell'acido usnico su un modello di guarigione delle ferite *in vitro* costituito da monostrati di cheratinociti HaCaT. La linea cellulare HaCaT ha in comune molte proprietà dei normali cheratinociti epidermici.

Per la valutazione dell'attività di guarigione delle ferite *in vivo*, i composti sono stati miscelati con un veicolo costituito da glicole stearato, 1,2 propilen glicole, paraffina liquida (3:6:1) in concentrazione dell'1%. Sono stati impiegati modelli con incisione lineare mediante tensiometro e ferita di escissione circolare.

In questo studio sono stati in grado di attribuire significative proprietà di guarigione delle ferite a singoli derivati dell'acido usnico. I risultati dei test *in vitro* e *in vivo* erano abbastanza coerenti, mostrando citotossicità più bassa associata a una migliore capacità di indurre guarigione per alcuni derivati dell'acido usnico, che nella maggior parte dei casi erano preferibili al loro precursore. Questi dati suggeriscono il possibile utilizzo di questi composti in preparati per la cura della pelle che promuovono la guarigione delle ferite o anti-tietà.

Uno studio condotto da Nunes *et al.* (2010) ha avuto come obiettivo quello di valutare l'effetto di film di collagene contenenti acido usnico come medicazione per la guarigione di ustioni cutanee. Sono state eseguite ferite da ustione di secondo grado in quarantacinque ratti Wistar, assegnati in nove gruppi: COL—animali trattati con film a base di collagene; PHO—animali trattati con film di collagene contenenti liposomi vuoti; UAL—animali trattati con film a base di collagene contenenti acido usnico incorporato in liposomi. Dopo 7, 14 e 21 giorni, gli animali sono stati soppressi. Gli autori hanno osservato che il giorno 7, il gruppo UAL presentava una moderata infiltrazione di neutrofili distribuiti in tutte le ferite da ustione, mentre nei gruppi COL o PHO, la gravità della reazione era più lieve e ancora limitata ai margini delle ustioni. Il giorno 14, la reazione infiammatoria è stata meno intensa in tessuti trattati con UAL, con notevole infiltrazione di plasmacellule, mentre la gravità dell'infiammazione variava da moderata a intensa, con profilo cronico nella parte profonda e acuto nella parte superiore delle ustioni, nei gruppi COL e PHO. La causa alla base dell'infiammazione intensa nel gruppo trattato con film di collagene senza acido usnico, sta nel fatto che, sebbene il collagene presenti numerosi effetti biomodulatori, queste molecole non mostrano attività antinfiammatoria. 21 giorni dopo l'ustione, la gravità della reazione infiammatoria era evidentemente ridotta in UAL rispetto agli altri gruppi. È stato osservato che al 14° giorno, l'uso di UAL aveva portato a una più rapida sostituzione del collagene di tipo III con il tipo I, mentre entro il 21° giorno la densità di collagene era migliorata, permettendo di concludere che l'uso di film a base di collagene contenenti UA portasse a un miglioramento del processo di guarigione dell'ustione nei ratti. Il tasso di epitelizzazione era significativamente più alto in UAL rispetto a COL e PHO in 7 giorni (Figura 12).

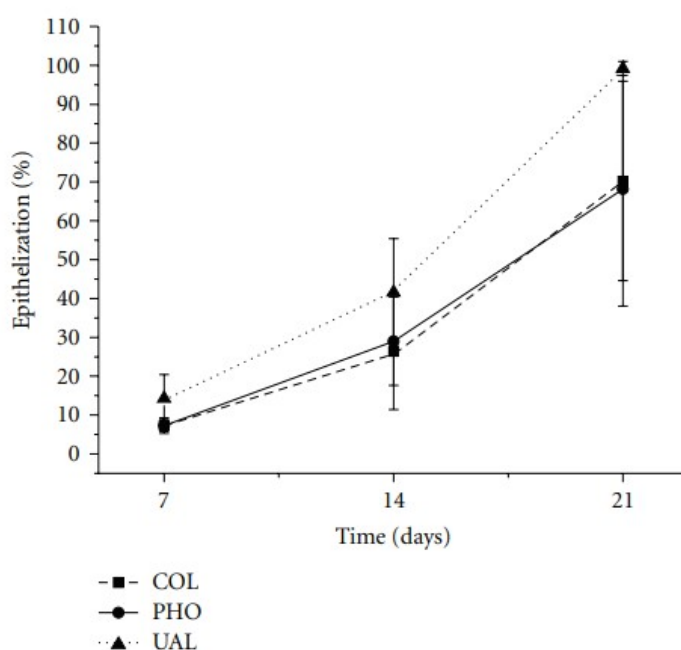


Figura 12. Epitelizzazione della superficie della ferita da ustione.

Recenti studi hanno dimostrato che l'acido usnico mostra proprietà redox-attive variabili, agendo come antiossidante e agente pro-ossidante, a seconda delle diverse condizioni del sistema e/o dell'ambiente cellulare. L'effetto antiossidante dell'UA è sicuramente associato alla capacità di questo metabolita secondario di eseguire lo scavenging dei radicali perossilici, estinguere i

radicali idrossilici e ridurre la produzione di nitrito. Nei sistemi ricchi di lipidi, l'acido usnico ha presentato una capacità pro-ossidante.

In altri studi, l'UA ha mostrato un comportamento pro-ossidante e anche antiossidante in base alle concentrazioni utilizzate. L'UA estratto da *Xanthoparmelia farinosa* è stato utilizzato in una linea cellulare di linfociti umani (cellule Jurkat) sotto irraggiamento UVB, causando effetti dannosi letali sulle membrane cellulari e riducendo il metabolismo cellulare quando utilizzato in una concentrazione elevata. Tuttavia, a basse concentrazioni e bassa intensità di UVB, l'acido usnico ha mostrato una funzione antiossidante (Kohlhardt-Floehr *et al.* 2010).

Altra rilevante attività attribuita all'acido usnico è quella antinfiammatoria.

Vijayakumar e collaboratori hanno dimostrato che l'acido usnico isolato dal lichene *Roccella montagnei*, mostrava un'attività antinfiammatoria dose-dipendente quando testato su ratti. Questi risultati potrebbero essere correlati alle proprietà biologiche dell'UA, che possono essere coinvolti nell'inibizione della sintesi delle prostaglandine, in modo simile ai farmaci antinfiammatori non steroidei (Vijayakumar *et al.* 2000).

Su *et al.* (2014) hanno valutato l'effetto e il possibile meccanismo dell'acido usnico sul danno polmonare acuto (ALI) indotto da LPS, evidenziando che il pretrattamento con acido usnico ha migliorato significativamente il tasso di sopravvivenza all'edema polmonare.

La valutazione dell'attività antinfiammatoria ha indicato che l'acido usnico attenuava l'espressione del fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- α), interleuchina-6 (IL-6), interleuchina-8 (IL-8) e proteina infiammatoria-2 dei macrofagi (MIP-2). La riduzione del livello di interleuchina-10 (IL-10) è stato anche osservato nel liquido di lavaggio broncoalveolare (BALF).

Questi i dati hanno mostrato che l'effetto protettivo dell'acido usnico sull'ALI indotta da LPS nei topi potrebbe essere correlato alla soppressione di risposte infiammatorie eccessive e stress ossidativo nel tessuto polmonare. Pertanto, è stato suggerito che l'acido usnico potrebbe essere un potenziale agente terapeutico per ALI.

CAPITOLO 3

TOSSICITÀ ACIDO USNICO E MECCANISMO D'AZIONE

TOSSICITÀ

La comunità scientifica si è adoperata per chiarire i meccanismi biochimici e molecolari coinvolti sia nelle attività biologiche dell'acido usnico che nella sua tossicità.

Nonostante le interessanti proprietà farmacologiche di UA, la sua tossicità è stata studiata in diversi saggi *in vitro* (Pramyothin *et al.* 2004), *in vivo* (Chitturi e Farrel 2008) e in pazienti umani (Sanchez *et al.* 2006; Chitturi e Farrel 2008; Foti *et al.* 2008).

Prokopiev *et al.* (2017) hanno studiato l'effetto genotossico di entrambi gli enantiomeri dell'acido usnico *in vitro* sui linfociti presenti nel sangue umano.

Per questo studio sono stati isolati gli enantiomeri dell'acido (+)-usnico da *Cladonia arbuscula* e acido (-)-usnico da *Cladonia stellaris* (Figura 13). Questi licheni, che crescono al centro della Yakutia, sono stati scelti perché contengono prevalentemente questi isomeri ottici.

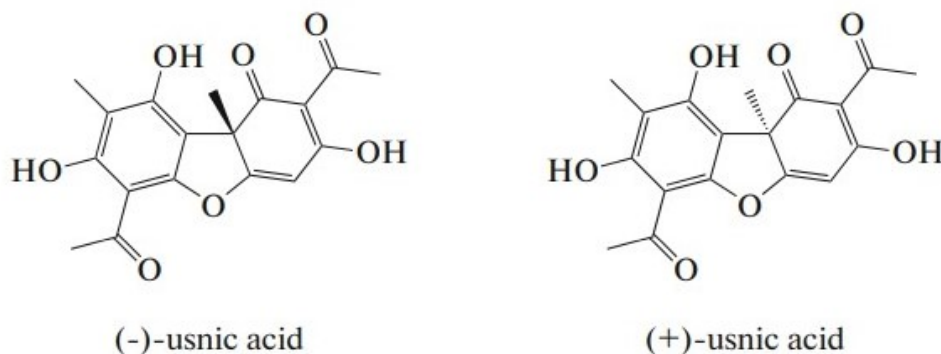


Figura 13. Struttura chimica degli enantiomeri dell'acido usnico

L'effetto genotossico degli enantiomeri dell'acido usnico è stato valutato determinando l'entità del danno al DNA nei linfociti mediante elettroforesi su gel alcalino di cellule isolate, saggio conosciuto in letteratura come test della cometa.

Lo studio sulla vitalità dei linfociti del sangue periferico ha mostrato una sostanziale azione citotossica a varie concentrazioni degli enantiomeri dell'acido (+)- e (-)-usnico.

È stato osservato che con la presenza di uno degli enantiomeri di acido usnico in concentrazioni comprese tra 0,04 e 0,30 μm , il numero di cellule viventi era 1,1 – 7,0 volte inferiore rispetto al controllo (Figura 14).

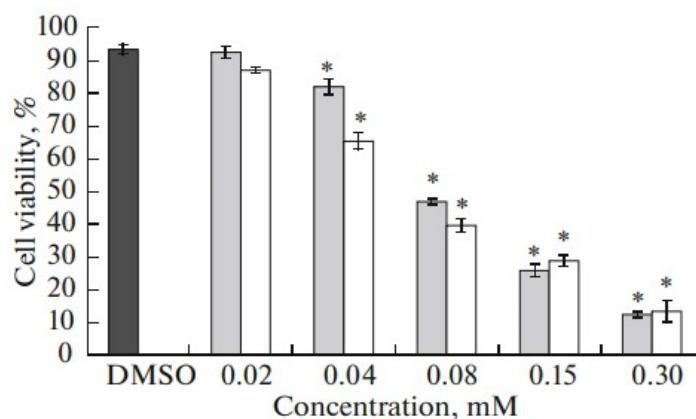


Figura 14. Vitalità dei linfociti sotto l'azione di varie concentrazioni di acido (-) e (+) usnico. Barre grigie enantiomero (-), barre bianche enantiomero (+), l'asterisco indica la significatività rispetto al controllo negativo (1% DMSO, barra nera)

È stato inoltre dimostrato che l'acido (-)-usnico in concentrazioni di 0,04 e 0,08 μM ha indotto un'azione citotossica sui linfociti meno pronunciata rispetto al suo stereoisomero (+). Questo dato era una conferma dei risultati ottenuti da Koparal *et al.* (2006) nelle cellule V79 e A549 che aveva evidenziato che l'acido (+)-usnico aveva una citotossicità più pronunciata rispetto all'enantiomero (-).

Uno dei meccanismi dell'azione citotossica dell'acido usnico, può consistere nella perdita del potenziale della membrana mitocondriale a causa del disaccoppiamento della respirazione e della fosforilazione ossidativa, che provoca una diminuzione della sintesi di ATP, un aumento del pool di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e successiva morte cellulare.

Gli autori hanno studiato la genotossicità a varie concentrazioni dei due enantiomeri dell'acido usnico *in vitro* nei linfociti del sangue umano periferico mediante test della cometa del DNA in mezzo alcalino.

Il grado di danno al DNA (% DNA nella coda della cometa) dopo l'incubazione dei linfociti con gli enantiomeri (+) e (-)-dell'acido usnico in concentrazioni di 0,04–0,30 μM era 3,0–14,0 e 2,0–35,0 volte superiore rispetto al controllo negativo, rispettivamente. Inoltre l'azione genotossica di (-)-acido usnico in concentrazioni di 0,15 e 0,30 μM era in media 2,0 volte superiore a quello dell'isomero (+) nelle stesse concentrazioni.

Una maggiore genotossicità dell'acido (-)-usnico realizzata tramite rotture a filamento singolo del DNA, può essere la ragione della formazione di maggiori quantità di cellule apoptotiche nella popolazione di linfociti umani, che sono stati in precedenza osservato da altri autori (Koparal *et al.*, 2006).

L'azione degli enantiomeri dell'acido usnico studiato è stata accompagnata dalla formazione di comete di DNA atipiche; inoltre, l'acido (-)-usnico ha indotto 2,5–3,5 volte più comete atipiche del suo (+)-enantiomero. Questo lascia supporre che le diverse azioni genotossiche degli enantiomeri (+) e (-) dell'acido usnico fossero i risultati della loro diversa attività chirale specifica.

Due anni dopo lo stesso gruppo di ricerca ha usato un test del DNA cometa per determinare l'effetto genotossico dell'acido (+)- e (-)-usnico sulle cellule del fegato e del rene di topi. L'effetto genotossico dell'acido usnico è stato osservato solo un'ora dopo la somministrazione orale con dosi di acido usnico di 100 e 50 mg/kg che hanno provocato danni al DNA nelle cellule del fegato e dei reni. Da questo studio non sono emerse differenze significative negli effetti degli enantiomeri (+)- e (-).

La tossicità maggiormente riportata dalle revisioni della letteratura è l'epatotossicità e per questa ragione sono stati condotti molteplici studi a tal riguardo.

In colture di epatociti primari di topo, UA ha causato principalmente necrosi senza apoptosi (Han *et al.* 2004). I meccanismi proposti per il danno epatico correlato all'acido usnico includono il disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa, inibizione della fosforilazione ossidativa, aumento dello stress ossidativo, perossidazione lipidica ed esaurimento del glutatione (GSH). L'interruzione della funzione respiratoria mitocondriale e lo stress ossidativo vanno a minare la vitalità cellulare. Sembrerebbe quindi che l'interruzione della funzione mitocondriale sia il meccanismo generale che sta alla base della tossicità d'organo.

I risultati degli studi di Pramyothin *et al.* (2004) hanno rivelato che (+)-acido usnico potrebbe presentare una epatotossicità paragonabile a quella del tetracloruro di carbonio (CCl₄) il quale viene metabolizzato nei ratti dal sistema del citocromo P450, in particolare dal CYP 2E1, a un metabolita altamente reattivo, il radicale libero triclorometile (CCl₃ •). Questo radicale libero può reagire con l'ossigeno e genera i radicali triclorometilperossidici (OOCCL₃).

Entrambi i radicali possono attaccare i lipidi sulla membrana cellulare e sulla membrana di strutture come i mitocondri e il reticolo endoplasmatico, stimolando la perossidazione lipidica, interferendo con l'omeostasi del Ca²⁺ e portando alla conseguente morte cellulare. Il danno all'integrità della membrana cellulare provoca il rilascio di enzimi epatospecifici cellulari, principalmente le transaminasi (AST, ALT). La reazione a catena di perossidazione lipidica genera i principali prodotti chiamati malondialdeide. Il glutatione è la molecola nucleofila più forte che si trova nella maggior parte delle cellule con la funzione di antiossidante, ne consegue quindi che i radicali liberi sono solitamente distrutti dal GSH.

In questo studio (Pramyothin *et al.* 2004), l'effetto epatotossico dell'acido (+)-usnico è stato studiato nei ratti, in particolare negli epatociti di ratto e nei mitocondri di fegato di ratto usando tetracloruro di carbonio come epatotossina di riferimento. L'acido (+)-usnico utilizzato è stato estratto da *Usnea siamensis* Wainio. I ratti sono stati divisi in quattro gruppi di otto animali ciascuno. Ai gruppi di controllo è stata somministrata una soluzione salina (0,1 mL al giorno, i.p.) o DMSO (0,1 mL al giorno, i.p.) per 5 giorni. I gruppi di prova sono stati trattati con acido (+)-usnico (solubilizzato in DMSO) alle dosi di 50 o 200 mg/kg al giorno, per via intraperitoneale per 5 giorni. Alla fine del trattamento di 5 giorni, è stato prelevato un campione di sangue per la misurazione dell'attività delle transaminasi sieriche (AST, ALT) e i fegati sono stati asportati per studio istopatologico. Dopo 5 giorni di trattamento con acido (+)-usnico, nei ratti non è stato rilevato alcun cambiamento significativo nell'attività delle transaminasi sieriche (AST, ALT) mentre le micrografie elettroniche illustravano i segni di danno alle cellule del fegato come mostrato dal marcato rigonfiamento dei mitocondri e del reticolo endoplasmatico, specialmente alla dose di 200 mg/kg di acido (+)-usnico.

Lo studio sull'effetto citotossico dell'acido (+)-usnico in epatociti isolati di ratto ha dimostrato la relazione dose dipendente nel rilascio di transaminasi cellulare (AST, ALT) e formazione di malondialdeide (indice di perossidazione lipidica). DMSO, al volume utilizzato (10 µL) per solubilizzare l'acido (+)-usnico non ha influito su questi criteri.

Quando è stata aumentata la dose di acido (+)-usnico l'attività delle transaminasi (AST, ALT) e la perossidazione lipidica aumentavano, mentre il contenuto di glutatione diminuiva.

CCl₄ (10 µL) è stato usato come epatotossina di riferimento e sono stati ottenuti risultati simili nel gruppo trattato con la dose più elevata di acido (+)-usnico (1 mM).

Nel presente studio quindi acido (+)-usnico e CCl₄ hanno dimostrato effetti citotossici simili e inoltre sono stati ottenuti risultati additivi con somministrazione combinata di acido(+)-usnico e CCl₄ (Tabella 7). Pertanto, sembra che l'acido (+)-usnico abbia gli stessi meccanismi epatotossici presentati da CCl₄.

Tabella 7. Effetti citotossici dell'acido (+)-usnico, CCl₄ e loro co-somministrazione negli epatociti di ratto

Group	Transaminase activity ^a		MDA ^a (nmol/g wet weight cells)	GSH ^a (μmol/g wet weight cells)
	AST	ALT		
Control	215.2 ± 11.6	280.7 ± 27.6	17.1 ± 0.7	3.7 ± 0.2
DMSO (10 μl)	238.6 ± 18.4	290.5 ± 29.1	15.0 ± 0.9	3.5 ± 0.3
CCl ₄ (10 μl)	515.1 ± 51.1 ^{*,**}	523.5 ± 39.8 ^{*,**}	26.9 ± 1.2 ^{*,**}	2.8 ± 0.2 [*]
(+)Usnic acid (0.01 mM)	276.0 ± 20.2	310.8 ± 38.3	14.3 ± 0.1	2.9 ± 0.1
(+)Usnic acid (0.1 mM)	280.3 ± 20.1	333.8 ± 27.2	19.1 ± 0.7 ^{*,**}	2.8 ± 0.1 ^{*,**}
(+)Usnic acid (1 mM)	361.8 ± 25.2 ^{*,**}	498.8 ± 19.7 ^{*,**}	26.4 ± 1.5 ^{*,**}	2.1 ± 0.1 ^{*,**}
(+)Usnic acid (0.01 mM) + CCl ₄	866.4±127.5 ^{*,**,*}	1010.3±204.2 ^{*,**,*}	35.6 ± 1.3 ^{*,**,*}	2.5 ± 0.1 ^{*,**}
(+)Usnic acid (0.1 mM) + CCl ₄	999.3±160.7 ^{*,**,*}	1229.0±164.8 ^{*,**,*}	46.2 ± 3.7 ^{*,**,*}	1.5 ± 0.1 ^{*,**,*}
(+)Usnic acid (1 mM) + CCl ₄	1144.3±54.7 ^{*,**,*}	1739.1±255.9 ^{*,**,*}	47.9 ±3.31 ^{*,**,*}	1.0 ± 0.2 ^{*,**,*}

S.F. units per milliliter × 0.48 = IU/l.

^a Values are mean ± S.E.

* Significantly different from control group, *p* < 0.05.

** Significantly different from DMSO group, *p* < 0.05.

*** Significantly different from CCl₄ group, *p* < 0.05.

Inoltre, l'anilina idrossilasi, il CYP2E1 nel sistema del citocromo P450, che metabolizza sia anilina che CCl₄ nei ratti, è aumentato in presenza di acido (+)-usnico.

Ciò indica che l'acido (+)-usnico può essere metabolizzato da CYP2E1. È noto che l'espressione di CYP2E1 di ratto è stimolato da molti xenobiotici che agiscono stabilizzando l'enzima (legandosi come substrato). Questa osservazione è emersa chiaramente nel presente studio, nel quale è stato osservato che l'attività dell'anilina idrossilasi aumentava all'aumentare delle dosi di acido (+)-usnico.

Conclusione dello studio è che l'effetto epatotossico dell'acido (+)-usnico è dovuto all'acido usnico stesso o ai suoi metaboliti reattivi che causano perdita dell'integrità della membrana e perdita delle funzioni mitocondriali .

Considerando i dati *in vivo* sulla tossicità, è stato condotto uno studio da Abo-Khatwa *et al.* (2015) che partiva dai dati suggeriti da un precedente studio, ossia che l'attività antibiotica dell'acido (+)-usnico fosse correlata alla sua capacità di interrompere il metabolismo energetico inibendo selettivamente la biosintesi dell'ATP. Questo suggerimento era basato sul fatto che l'acido (+)-usnico mostrava una caratteristica attività di disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa nei mitocondri del fegato di topo *in vitro* simile a quello prodotto dal disaccoppiatore 2,4-dinitrofenolo (DNP). Poiché l'attività disaccoppiante dell'acido (+)-usnico sui mitocondri isolati *in vitro* dovrebbe riflettere effetti simili operando *in vivo*, il presente studio è stato condotto per determinarne gli effetti sui mitocondri epatici isolati da animali intossicati *in vivo*.

L'acido usnico utilizzato è stato estratto da *Usnea articulata*. Per determinare la tossicità di *U. articulata* sono stati iniettati nei topi un estratto idrosolubile (estratto etanolic; EE) e un estratto liposolubile (estratto in cloroformio; CE). Non è stata osservata mortalità per l'EE alla dose di 3,2 mg/kg. L'EE contiene principalmente la frazione idrosolubile del tallo del lichene e questi composti dovrebbero avere tossicità nulla o molto bassa per gli animali da esperimento. Diversamente, il CE era tossico per i topi (LD50 = 240 mg/kg). Questa tossicità è senza dubbio

dovuta alla presenza di acido (+)-usnico. Questo fatto è stato ulteriormente confermato utilizzando cristalli di acido usnico puro (+) isolato da questo estratto (Tabella 8).

Tabella 8. Tossicità dell'acido (+)-usnico nei topi

(+) usnic acid* (mg/kg)	n**	% Mortality***
0.0	24	0.0
80	23	0.0
120	30	36.7
160	25	40.0
200	23	52.2
240	23	60.9
280	24	100.0

* (+) Usnic acid was dissolved in corn-oil and 1 ml/mouse was injected (s.c.) to give final concentration as indicated; corn oil alone (0.0)/mouse was injected (s.c.) (1ml/mouse) as control.

** n = number of mice.

*** 24 h after administration.

I segni clinici, che hanno accompagnato la somministrazione di una dose letale di CE o di un campione puro di acido (+)-usnico, sono iniziati entro 5 minuti dopo l'iniezione manifestandosi con irrequietezza, paralisi spastica, evidenti brividi agli arti e acrocianosi osservata immediatamente prima del momento della morte.

La tossicità dell'acido (+)-usnico sui topi è simile a quella prodotta dal 2,4-dinitrofenolo (DNP) che è una sostanza altamente tossica (la LD50 di somministrazione orale nei ratti è di 30 mg/kg). Caratteristiche comuni dell'avvelenamento letale dato da entrambi i composti sono la loro lenta azione e la produzione di un inizio quasi immediato del rigor mortis.

Nel presente studio, il trattamento dei topi con una dose letale (200 mg/kg) di acido (+)-usnico ha mostrato una serie di effetti avversi sulla funzione mitocondriale simili a quelli ottenuti dagli studi *in vitro*. È stato pertanto concluso che l'effetto tossico prodotto dall'acido (+)-usnico sui topi è probabilmente correlato alla sua capacità di interferire con l'energia prodotta dai mitocondri, in particolare con il meccanismo di produzione di ATP. La perdita di ATP dalla cellula può portare ad un aumento del Ca²⁺ citosolico e alla contemporanea interruzione della Na⁺/K⁺-ATPasi e altri sistemi di trasporto. Questi cambiamenti sono di solito sufficienti a causare danni biochimici e patologici avversi alla maggior parte delle cellule animali, che possono portare alla morte cellulare.

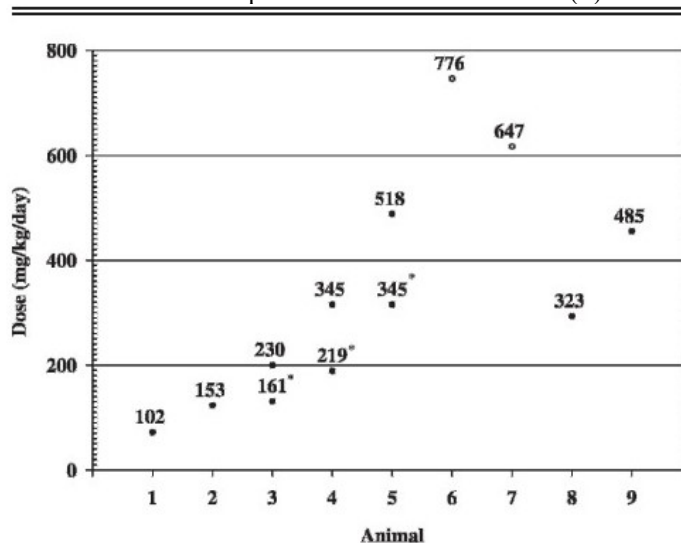
Per quanto riguarda il meccanismo di disaccoppiamento mitocondriale da parte dell'acido usnico, si ritiene che l'acido usnico sia tra i cosiddetti disaccoppiatori protonoforici (cioè ionofori che trasportano protoni) che costituiscono la classe più importante di potenti disaccoppiatori.

Un altro studio condotto da Dailey *et al.* (2008) partiva dal fatto che la tossicità in seguito all'ingestione del lichene *Xanthoparmelia chlorochroa* era stata identificata come l'eziologia presunta nella morte di circa 400-500 alci sul Red Rim-Daley Wildlife Habitat Management, area

nel Wyoming, durante l'inverno del 2004. Un unico rapporto nel 1939 attribuiva la tossicità di *X. chlorochroa* nei bovini e negli ovini all'acido usnico.

Per verificare l'ipotesi che l'acido usnico fosse la causa di morte negli animali avvelenati dal lichene, è stato testato il suo effetto sulle pecore domestiche. A seguito della somministrazione di acido (+)-usnico i segni clinici nelle pecore includevano letargia, anoressia e segni di disagio addominale. Inoltre, nella pecora sintomatica la creatina chinasi sierica, le attività dell'aspartato aminotransferasi e della lattato deidrogenasi erano considerevolmente elevate e solo le pecore sintomatiche avevano mostrato visibili lesioni post mortem. La dose tossica mediana (ED50) di acido (+)-usnico nelle pecore domestiche è stata stimata tra 485 e 647 mg/kg/giorno per 7 giorni (Tabella 9).

Tabella 9. Effetti dopo somministrazione di acido (+)-usnico



* Represents the actual dose ingested for ewes 3, 4, and 5. Doses designated with a solid circle represent ewes that were unaffected, while open circles represent ewes that were affected.

L'acido usnico è stato inoltre associato a grave danno al fegato (epatotossicità) se assunto come integratore alimentare ai fini della perdita di peso. Le dosi relativamente elevate di UA necessarie per ottenere la riduzione del peso possono causare gravi effetti collaterali: la Food and Drug Administration ha ricevuto almeno 21 segnalazioni di epatotossicità nei consumatori che hanno ingerito integratori alimentari contenenti UA o usnato di sodio per la perdita di peso, sollevando così problemi di sicurezza. Questa epatotossicità ha provocato una morte, un trapianto di fegato, sette soggetti con insufficienza epatica, dieci casi di epatite chimica e quattro casi di lieve tossicità epatica (Favreau *et al.* 2002)

Questo integratore era commercializzato con il nome di LipoKinetix e la sua composizione per capsula era: acido usnico (100 mg), norefedrina cloridrato (25 mg), 3,5- diiodotironina (100 µg), yohimbina cloridrato (3 mg) e caffeina (100 mg) (Neff *et al.* 2004). Nessun rapporto pubblicato ha descritto epatotossicità associata a uno qualsiasi degli altri componenti in LipoKinetix.

Durazo *et al.* (2004) hanno riportato un caso di insufficienza epatica fulminante in una paziente di 28 anni che assumeva integratori contenenti acido usnico per la riduzione del peso.

Sanchez *et al.* (2006) hanno descritto due pazienti sani che hanno sviluppato una grave epatotossicità, che in uno di loro si è evoluta in insufficienza epatica fulminante (che ha richiesto trapianto di fegato), a seguito dell'assunzione 3 volte al giorno, in cicli di 2 settimane, di 3 capsule di UCP-1, un integratore alimentare commercializzato come prodotto dimagrante che contiene per capsula: acido usnico (150 mg), L-carnitina (525 mg) e piruvato di calcio (1050 mg).

Andiamo ad approfondire quello che si è rivelato essere il caso più grave. La paziente era una donna di 38 anni, istruttrice di fitness in un club di atletica, precedentemente sana, senza fattori di rischio per malattie epatiche, ricoverata in ospedale in un paese asiatico (Singapore) per malessere di nuova insorgenza, disturbi addominali e ittero. I suoi sintomi erano progrediti lentamente nel corso di un periodo di 2 settimane. Lei e suo marito (il secondo caso trattato dal presente studio) stavano assumendo l'integratore UCP-1 da 3 mesi e avevano assunto la dose raccomandata di 3 capsule 3 volte al giorno in cicli di 2 settimane. Durante il ricovero, la paziente ha sviluppato un'encefalopatia epatica precoce subito trattata in ambiente ospedaliero. Nonostante queste misure, l'encefalopatia è peggiorata e la paziente è stata trasferita per un possibile trapianto di fegato. Lo screening farmacologico era negativo per acetaminofene o altri farmaci epatotossici e caratteristiche cliniche che suggerissero tossicità da paracetamolo (acidosi, insufficienza renale) erano assenti. I test si sono rivelati negativi per epatite virale, epatite autoimmune e la malattia di Wilson. La paziente è stata sottoposta con successo a trapianto di fegato d'urgenza.

L'espianto dell'organo ha rivelato un fegato rimpicciolito che pesava 451 g (peso previsto 1240 g) con diffusa necrosi parenchimale.

Sulla base di questi dati si può dedurre che l'uso dell'acido usnico deve essere considerato un potenziale fattore di rischio di insufficienza epatica fulminante.

Oltre a diversi rapporti che menzionano il danno epatico indotto da UA, i test *in vitro* hanno dimostrato anche neurotossicità dose-dipendente (Rabelo *et al.* 2012). Infatti UA diminuiva la vitalità cellulare di cellule simili a neuroni (SH-SY5Y) in coltura. Questo effetto è associato alla capacità di UA di aumentare la produzione intracellulare di ROS in queste cellule.

MECCANISMO D'AZIONE

Diversi modelli di studio (*in silico*, *in vitro* e *in vivo*) hanno correlato il meccanismo d'azione dell'acido usnico a interruzione della funzione mitocondriale, alterazioni dello stress ossidativo e induzione della morte cellulare.

Essendo un acido debole con caratteristiche lipofile, la sua diffusione attraverso la membrana mitocondriale è favorita, causando l'inibizione della produzione di ATP nella via della fosforilazione ossidativa.

L'influenza dell'acido usnico sulla respirazione cellulare è stata citata per la prima volta da Johnson *et al.* (1950), che hanno studiato il disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa su rene e fegato di ratto, con concentrazioni minime di 1,3-2,6 µg/mL di acido usnico. Da allora vari scienziati hanno condiviso risultati che hanno confermato questa ipotesi.

Vavasseur *et al.* (1991) hanno studiato il potenziale inibitorio dell'acido usnico sui processi respiratori aerobici in cellule vegetali di *Cormmelina communis*. Dato che le vie mitocondriali sono importanti nella regolazione degli stadi per sintetizzare ATP, se non funzionano correttamente, la conseguenza per ogni cellula che respira è la morte.

L'interferenza nella respirazione cellulare, la riduzione della sintesi proteica e di RNA sono i principali meccanismi attribuiti all'acido usnico attraverso i quali va a ridurre la vitalità delle cellule tumorali (capacità antitumorale) senza comportare danni al DNA (Mayer *et al.* 2005).

Inoltre, l'effetto antitumorale di UA può essere anche una conseguenza delle variazioni del gradiente di pH in cellule cancerose, come mostrato nelle cellule T47D (linea di cancro alla mammella) e nelle cellule Capan-2 (linea di cancro al pancreas), nelle quali sono state osservate modifiche nei trasportatori di protoni della membrana plasmatica, che portano alla generazione di un gradiente elettrochimico, consentendo l'accumulo di acidi deboli all'interno (Bessadottir *et al.* 2012).

Come già descritto, in uno studio condotto da Pramyothin *et al.* (2004) era stato dimostrato che l'acido usnico aveva alterato l'integrità delle membrane degli epatociti, portando al rilascio di enzimi epato-specifici (aspartato aminotransferasi e alanina aminotransferasi), e al blocco della funzione mitocondriale.

Sempre nel 2004, Han *et al.*, utilizzando modelli murini, hanno evidenziato che il trattamento di colture di epatociti con 5 mM e 10 mM di acido usnico causava il 98% e il 100% di necrosi tissutale (epatotossicità). Inoltre sono state osservate riduzione dei livelli di ATP e inibizione della respirazione mitocondriale. Gli autori hanno anche identificato un'inibizione diretta della funzione mitocondriale che ha portato a una diminuzione dell'assorbimento di ossigeno e alla conseguente morte cellulare.

Moreira *et al.* (2013) hanno osservato che basse concentrazioni di acido usnico (1–5 μM) stimolano il consumo di ossigeno riducendo il rapporto NADH/NAD⁺ mitocondriale, inibiscono fortemente la gluconeogenesi, ma inducono glicolisi, β -ossidazione, glicogenolisi e inibiscono l'ureogenesi, causando un ritardo della chetogenesi. Al contrario, alte concentrazioni di UA (10 μM) hanno bloccato la catena di trasporto degli elettroni e l'ossidazione degli acidi grassi a media catena. Pertanto, questi eventi dannosi combinati portano a una diminuzione della glicolisi epatica, alla domanda di chetoni dal cervello e l'aumento della produzione di ammoniaca.

Studi *in silico* supportano l'ipotesi che l'esposizione all'acido usnico provochi disturbi nel metabolismo energetico degli aminoacidi, dei lipidi e nucleotidi attraverso lo stress ossidativo (Lu *et al.* 2011). In questo studio, il meccanismo del danno epatico indotto da acido (+)-usnico è stato studiato attraverso l'esame di estratti di plasma e tessuto epatico ottenuti dai ratti ripetutamente esposti a diverse dosi di acido usnico utilizzando gascromatografia-spettrometria di massa (GC-MS).

Sono stati eseguiti simultaneamente analisi biochimiche del siero ed esami istopatologici. L'obiettivo dello studio era quello di determinare l'impatto di tossicità dell'acido usnico sulle vie metaboliche per acquisire un'ulteriore comprensione dei sottostanti meccanismi molecolari e ricercare potenziali biomarcatori.

In primo luogo, è stata studiata la tossicità acuta dell'acido usnico. Più del 50% dei ratti è morto entro 8 giorni con dosi di 240 mg/kg, mentre nessun decesso si è verificato nei gruppi trattati con 100 e 200 mg/kg. Sono stati misurati i pesi corporei e i rapporti fegato/peso corporeo per determinare i cambiamenti fisiologici di questi parametri negli animali da esperimento dei gruppi trattati con 100 e 200 mg/kg. L'aumento di peso corporeo non ha mostrato cambiamenti significativi nei ratti nei quali erano stati somministrati 100 mg/kg di acido usnico per 8 giorni mentre il peso era diminuito nei ratti trattati con 200 mg/kg di acido usnico. La diminuzione può essere un risultato attribuibile alle proprietà dimagranti di acido usnico. I rapporti fegato/peso corporeo erano significativamente aumentati nei gruppi trattati con acido usnico in modo dose-

dipendente e nel gruppo trattato con la dose di 200 mg/kg è aumentato del 16,4% rispetto al gruppo di controllo.

Questi risultati indicano che la condizione fisiologica degli animali utilizzati nell'esperimento potrebbero iniziare a cambiare al di sopra di 100 mg/kg e potrebbero cambiare significativamente da 200 mg/kg. (Figura 15)

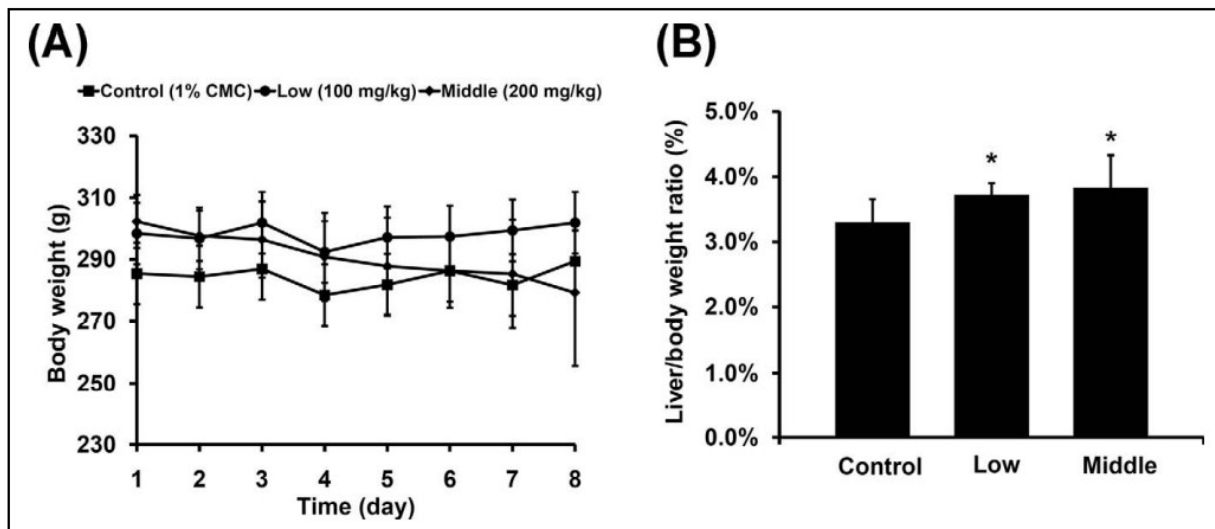


Figura 15. A. Cambiamenti nel peso corporeo dopo somministrazioni multiple di acido usnico per 8 giorni. B. Cambiamenti nel rapporto tra peso del fegato e corporeo dopo trattamento con acido usnico al giorno 9.

Sono stati prelevati cuore, fegato, milza, polmone e reni nei ratti deceduti appartenenti al gruppo trattato con 240 mg/kg. Non sono stati rilevati danni evidenti nei tessuti del cuore, della milza, dei polmoni e dei reni in tutti i ratti trattati con acido usnico, tranne nel tessuto epatico.

In questo studio, è stato dimostrato un danno epatico indotto da acido usnico nei ratti a dosi elevate, ma è stato anche dimostrato che anche l'acido usnico a basse dosi induceva disturbi nel metabolismo energetico, metabolismo degli aminoacidi, metabolismo dei lipidi e metabolismo dei nucleotidi come il trattamento a dose più elevata, ciò può essere dovuto agli effetti tossici dell'acido usnico sul fegato causati dallo stress ossidativo.

L'acido usnico è lipofilo sia in forma neutra che anionica a causa dei suoi gruppi β -trichetonici che assorbono la carica negativa dell'anione mediante stabilizzazione per risonanza. Può passare attraverso la membrana mitocondriale interna per diffusione passiva nella matrice grazie alla sua lipofilia, dove viene ionizzato e rilasciato come un protone nella matrice.

L'anione usneato risultante può quindi diffondere nuovamente nello spazio intermembrana dove si lega ad un protone sul lato acido della membrana interna per riformare l'acido usnico che può poi tornare nuovamente nella matrice. Questo ciclo causa la perdita di protoni e la conseguente dissipazione del gradiente protonico della membrana interna interrompendo lo stretto accoppiamento fra trasporto di elettroni e sintesi di ATP. Si ritiene che questi effetti svolgano un ruolo importante nel danno epatico indotto dall'acido usnico.

Inoltre secondo Piska *et al.* (2018) la formazione di metaboliti reattivi di UA potrebbe spiegare la sua epatotossicità. È stato quindi concluso che l'azione dell'acido usnico come disaccoppiante della fosforilazione ossidativa, inizialmente suggerita nel 1950, è stata confermata da diversi studi (*in silico*, *in vitro* e *in vivo*) e da analisi biochimica, istopatologica, genomica e proteomica.

CAPITOLO 4

APPLICAZIONI NANOTECNOLOGICHE

Come evidenziato nei precedenti capitoli, è possibile osservare varie e promettenti attività biologiche riferite all'acido usnico, ma sussiste il problema legato alla sua tossicità, in particolare alla epatotossicità. È da ricordare inoltre la sua bassa solubilità in acqua che lo porta ad avere una ridotta efficacia. Per queste ragioni è stato studiato lo sviluppo di alternative innovative, come il suo incapsulamento in sistemi a rilascio controllato, un importante strumento della nanotecnologia farmaceutica.

I sistemi a rilascio controllato consentono di modulare il rilascio del principio attivo incapsulato in concentrazioni all'interno del range terapeutico, con conseguente riduzione del regime posologico e aumento della sua efficacia riducendo al minimo gli effetti collaterali. In questo senso, l'incapsulazione dell'acido usnico è diventata una strategia promettente per superare i suoi ostacoli fisico-chimici e tossicologici e migliorarne gli scopi biologici.

Nel 2004 Ribeiro-Costa *et al.* hanno descritto per la prima volta l'incapsulamento dell'acido usnico in microsfele formate da copolimero di acido lattico e acido glicolico (PLGA). Questi sistemi di rilascio polimerici sono stati in grado di massimizzare l'attività terapeutica riducendo gli effetti collaterali degli agenti antitumorali.

Microsfele di PLGA contenenti acido usnico estratto da *Cladonia substellata* sono state preparate con il metodo della doppia emulsione, con o senza PEG come stabilizzante. Il contenuto di acido usnico nelle microsfele è stato analizzato mediante HPLC. La citotossicità dell'acido usnico libero e incapsulato è stata valutata rispetto alle cellule HEP-2 utilizzando il metodo MTT. Il test antitumorale è stato eseguito nei topi contro il tumore del sarcoma-180 (UA 15 mg/kg-1 peso corporeo/giorno) per 7 giorni. Gli animali sono stati quindi sacrificati e il tumore e gli organi sono stati asportati per l'analisi istopatologica.

Al quinto giorno è stato raggiunto un rilascio massimo del 92%. I valori di IC50 per l'acido usnico libero e incapsulato erano rispettivamente di 12 e 14 µg/mL.

Il gruppo trattato con UA, nella sua forma libera, mostrava il 42% di inibizione del tumore rispetto al gruppo di controllo, mentre un 63% di inibizione del tumore è stato ottenuto per il gruppo trattato con microsfele di UA. L'incapsulamento dell'acido usnico in microsfele ha favorito un aumento del 21% dell'inibizione del tumore rispetto al trattamento con acido usnico libero.

In sintesi, l'acido usnico è stato efficacemente incapsulato nelle microsfele PLGA e la microincapsulazione ha migliorato la sua attività antitumorale. Quindi, il potenziamento dell'attività antitumorale dell'acido usnico tramite incapsulazione ha stimolato ulteriori studi per aumentarne le attività biologiche tramite sistemi a rilascio controllato.

Le nanoparticelle polimeriche sono diventate una preziosa area di ricerca nel campo dei sistemi di somministrazione di farmaci perché sono in grado di rilasciare un vasto assortimento di principi attivi verso diversi bersagli nel corpo per periodi di tempo prolungati. I polimeri naturali non sono stati ampiamente utilizzati per questo scopo poiché variano in purezza e spesso richiedono cross-linking che potrebbe denaturare il farmaco incorporato.

Di conseguenza, polimeri sintetici hanno ricevuto particolare attenzione in questo campo. I più diffusi polimeri per la produzione di nanoparticelle sono il poli-ε-caprolattone (PCL), il poli-acido lattico (PLA), il poli-acido glicolico (PGA) e i loro copolimeri, poli-lattide-co-glicolide (PLGA). Tali polimeri sono noti per la loro biocompatibilità.

In uno studio condotto nel 2005 da Santos *et al.*, l'obiettivo era quello di sviluppare nanocapsule PLGA contenente acido usnico purificato da *Cladonia substellata* al fine di migliorare la biodisponibilità dell'acido usnico e diminuire la sua tossicità epatica, consentendone così la somministrazione attraverso la via iniettabile.

Il profilo cinetico *in vitro* e la citotossicità sono state valutate sulle cellule di carcinoma polmonare umano (NCI-H 292). L'analisi morfologica delle cellule dopo il trattamento con acido usnico libero e acido usnico incapsulato è stato eseguito anche mediante microscopia ottica. Il saggio di citotossicità dell'acido usnico libero e incapsulato è stato eseguito su cellule di carcinoma polmonare umano (NCI-H 292) coltivate in MEM.

La citotossicità dell'acido usnico libero e delle nanocapsule caricate con acido usnico è stato determinato misurando l'inibizione della proliferazione cellulare utilizzando il test MTT. Le cellule sono state trattate con una soluzione di acido usnico (0,4% DMSO) o nanocapsule caricate con acido usnico a concentrazioni comprese tra 2,5 a 20 µg/mL. L'MTT è stato aggiunto al mezzo di coltura dopo 72 ore di incubazione cellulare ed è stata determinata la percentuale di vitalità cellulare.

Nel tentativo di ottimizzare la quantità di acido usnico incorporato in nanocapsule PLGA (UA-NC), sono state valutate diverse condizioni sperimentali. Gli studi di pre-formulazione sono stati eseguiti variando la concentrazione dei costituenti al fine di migliorare la stabilità del preparato (Tabella 10).

Tabella 10. Formulazioni di nanocapsule contenenti acido usnico

	UA-NC formulations									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Organic phase										
PLGA (mg)	250	200	160	150	150	170	150	120	150	150
Epikuron 200 (mg)	250	180	150	150	170	150	170	150	150	150
Acetone (ml)	28	28	28	28	28	24	24	24	24	24
Soybean oil (mg)	250	160	160	150	150	150	120	120	100	100
Uronic acid (mg)	50	20	15	10	10	10	20	10	10	10
Aqueous phase										
Poloxamer (mg)	250	180	150	150	170	150	170	150	150	150
pH 7.4 phosphate buffer solution (ml)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50

Sono state sviluppate diverse formulazioni UA-NC e valutati in base alle loro caratteristiche fisico-chimiche e in base alla loro stabilità. La quantità di acido usnico incorporata nelle nanocapsule è stata gradualmente aumentata da 0,5 mg/mL a 5,0 mg/mL nel tentativo di migliorare l'efficienza di incapsulamento del farmaco. I tensioattivi lipofili e idrofili sono stati mantenuti in rapporto 1:1 (150 mg).

L'acido usnico può essere incapsulato in nanocapsule a una concentrazione massima di 1 mg/mL in quanto tutte le formulazioni con contenuto di acido usnico superiore a 1 mg/mL hanno mostrato aggregati e precipitazione di cristalli di farmaco (> 1,5 mg/mL) 48 h dopo la preparazione. Al contrario la completa assenza di aggregati o sedimenti a basse concentrazioni

di acido usnico (≤ 1 mg/mL) sembra indicare che il farmaco è stato completamente disciolto nella fase oleosa.

Una tipica formulazione UA-NC stabile presentava un rapporto farmaco:polimero 1:15 e un rapporto farmaco:fase oleosa 1:10 (Tabella 10, UA-NC 10).

La formulazione di nanocapsule UA-NC 10 ha mantenuto l'aspetto macroscopico iniziale quando sottoposto a sollecitazione meccanica attraverso dei test di resistenza. Questa formulazione è rimasta stabile senza alcun notevole cambiamento fisico-chimico dopo essere stata sottoposta a centrifugazione e a 45 cicli di congelamento-scongelo. UA-NC 10 è stato quindi selezionato per condurre ulteriori studi di stabilità.

Viene spesso utilizzata la liofilizzazione per migliorare la stabilità fisico-chimica delle nanoparticelle al fine di ottenere un prodotto farmaceuticamente accettabile, soprattutto in condizioni di conservazione sfavorevoli.

La vitalità cellulare di NCI-H 292 dopo il contatto con acido usnico libero e acido usnico incapsulato è riportata nella Figura 16.

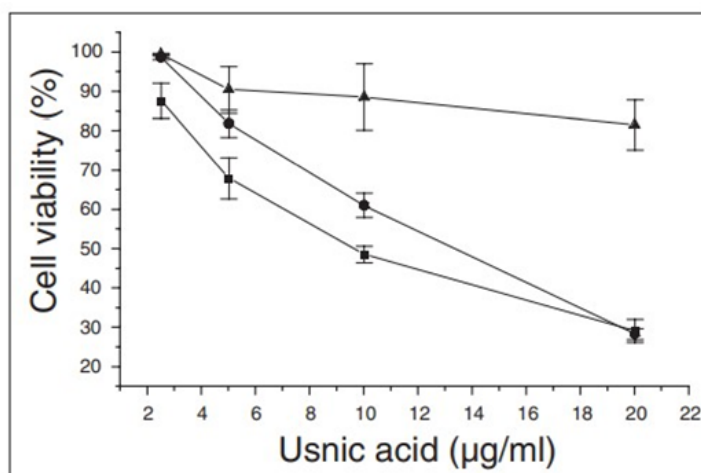


Figura 16. Citotossicità dell'acido usnico sulle cellule NCI-H 292: (■)acido usnico libero, (●) nanocapsule caricate con acido usnico e (▲)nanocapsule non caricate.

La vitalità cellulare è stata verificata con il metodo MTT a 72 h dopo il trattamento cellulare.

Una diminuzione della proliferazione cellulare (70%) è stata osservata sia a seguito del trattamento con acido usnico libero che con acido usnico incapsulato a 20 µg/mL per un tempo di esposizione di 72 h.

L'acido usnico non ha mostrato effetti citotossici a concentrazioni inferiori, di 2,5 µg/mL per le forme libere o incapsulate. Il valore di concentrazione inibente (IC₅₀) si è rivelato essere di 10 µg/mL per l'acido usnico libero e 13,8 µg/mL per l'acido usnico incapsulato. Inoltre le nanocapsule di PLGA non caricate non hanno mostrato azione citotossica sulle cellule NCI-H 292.

Poiché le nanocapsule non caricate non hanno avuto effetti citotossici sulle cellule NCI H 292, la citotossicità delle nanocapsule caricate con acido usnico (> 10 µg/mL) è da attribuire al meccanismo di diffusione dell'acido usnico dalle nanocapsule durante il lungo periodo di incubazione cellulare.

Infine, va sottolineato che l'effetto citotossico dell'acido usnico contro le cellule NCI-H 292 si è dimostrato considerevole. In condizioni sperimentali solo metà delle cellule sembrava essere

vitale ad una concentrazione di 10 µg/mL. La nanoincapsulazione ha promosso un'inibizione del tumore del 68%, mentre il trattamento con acido usnico libero del 45%.

Nel 2006, lo stesso gruppo di ricerca (Santos *et al.*) ha testato l'attività *in vivo* contro il sarcoma-180 inoculato per via sottocutanea nei topi, i quali sono stati trattati con 15 mg/kg al giorno di acido usnico per 7 giorni. È stato utilizzato sempre acido usnico incapsulato in PLGA estratto da *Cladonia substellata*. Inoltre, è stata valutata la tossicità subcronica in animali sani trattati con la stessa dose per 15 giorni. Ogni valutazione è stata eseguita confrontando la forma nanoincapsulata con una sospensione di acido usnico allo 0,5% con Tween 80, scelta in ragione della sua bassa solubilità in acqua.

Tutti gli animali sono sopravvissuti fino alla fine del trattamento e non sono state osservate anomalie cliniche o comportamentali. Gli animali non trattati presentavano un progressivo aumento della crescita del tumore, raggiungendo un peso della massa tumorale $1,07 \pm 0,15$ g in media 7 giorni dopo l'inoculazione con le cellule tumorali. Al contrario, il trattamento con l'acido usnico incapsulato ha prodotto una diminuzione della massa tumorale ($0,281 \pm 0,013$ g), diminuzione più marcata rispetto alla sospensione del farmaco ($0,995 \pm 0,050$ g).

Questi risultati mostrano che la forma di dosaggio dell'acido usnico incapsulato presenta un effetto di regressione del tumore più elevato di quello di acido usnico in sospensione.

Per quanto riguarda l'inibizione del tumore, si può osservare che il gruppo trattato con nanocapsule caricate con acido usnico presentava un'inibizione del $69,7 \pm 6\%$ rispetto al gruppo di controllo. La nanoincapsulazione migliorava l'attività dell'acido usnico del 26,4% rispetto alla sua forma in sospensione, che ha presentato un'attività antitumorale del $43,3 \pm 4\%$ rispetto al gruppo di controllo (Figura 17).

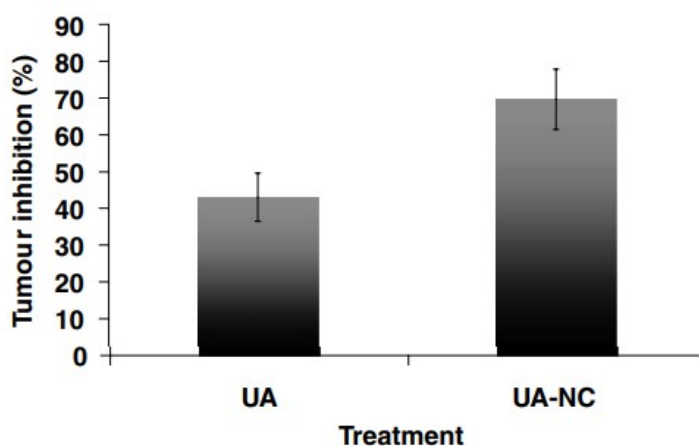


Figura 17. Valutazione dell'attività antitumorale di acido usnico libero e incapsulato contro il sarcoma 180 nei topi

Questi risultati *in vivo* confermano il meccanismo dell'attività antitumorale dell'acido usnico nei topi portatori di sarcoma 180 tramite necrosi senza coinvolgimento dell'apoptosi come già evidenziato da precedenti studi *in vitro*.

Sono state rilevate alterazioni morfologiche nel fegato degli animali trattati con acido usnico libero o incapsulato. È stata inoltre rilevata la presenza di necrosi epatocitica. Tuttavia, questa epatotossicità era inferiore negli animali trattati con nanocapsule caricate con acido usnico. L'analisi istopatologica del fegato mostra quindi che la nanoincapsulazione dell'acido usnico è

stata in grado di ridurre l'epatotossicità rispetto alla sospensione di acido usnico in Tween 80. Nessun cambiamento istologico è stato notato nella milza o reni degli animali trattati con acido usnico libero o incapsulato.

L'analisi della sopravvivenza di topi portatori di sarcoma 180 ha rivelato che il comportamento e i parametri clinici sono rimasti invariati nella prima settimana di trattamento degli animali sia con acido usnico libero che incapsulato. Dalla seconda settimana in poi, gli animali presentavano pelo ispido, riflessi ridotti, perdita di peso e irregolarità della frequenza respiratoria con conseguente morte (Figura 18).

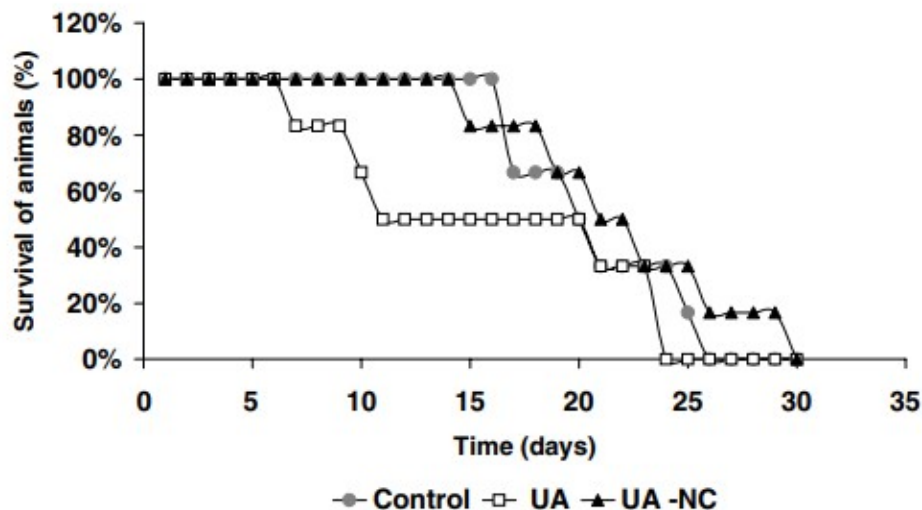


Figura 18. Valutazione della sopravvivenza al sarcoma 180 nei topi trattati con acido usnico libero (sospensione) e incapsulato (nanocapsule).

Il 50% degli animali trattati con sospensione di acido usnico era deceduto a 20 giorni, mentre il 100% era deceduto dopo 24 giorni dall'inoculazione del tumore. Inoltre, nel gruppo trattato con acido usnico incapsulato, è stato registrato un tasso di mortalità del 50% il 21° giorno e il 16,7% degli animali è sopravvissuto per 29 giorni. Durante questo periodo si sono presentate caratteristiche cliniche simili tra i gruppi, sebbene l'alterazione della frequenza respiratoria fosse più marcata nel gruppo di controllo. Nel gruppo di controllo, il tasso di mortalità è stato registrato 2 settimane dopo l'inoculazione del tumore: dopo 20 giorni si attestava al 50%, raggiungendo il 100% a 25 giorni.

Questi risultati mostrano che, nei 24 giorni dopo l'inoculazione del tumore, l'incapsulamento di acido usnico ha portato a un valore di tasso di sopravvivenza del 33% rispetto al gruppo trattato con la sospensione di acido usnico.

Non sono state evidenziate differenze statisticamente significative nel peso corporeo tra i gruppi di controllo e quelli trattati.

Anche in questo caso è stato dimostrato che l'incapsulamento dell'acido usnico nelle nanocapsule di PLGA era in grado di ridurre la tossicità epatica e migliorarne l'attività antitumorale.

Questi risultati suggeriscono anche chiaramente che la nanoincapsulazione può essere utilizzata come metodo per introdurre l'acido usnico nella chemioterapia.

Sono stati condotti studi anche per valutare l'attività antimicrobica di preparati liposomiali contenenti acido usnico.

In uno studio condotto da Lira *et al.* (2009) è stato valutato l'assorbimento cellulare e l'attività antimicobatterica dell'acido usnico (UA) e dei liposomi carichi di acido usnico (UA-LIPO) sui macrofagi J774.

Sono state determinate la concentrazione inibitoria minima (MIC) e la concentrazione battericida minima (MBC) di UA e UA-LIPO contro *Mycobacterium tuberculosis*. Le concentrazioni richieste per inibire il 50% della proliferazione cellulare (IC50) erano 22,5 ($\pm 0,60$) e 12,5 ($\pm 0,26$) $\mu\text{g/mL}$, rispettivamente per UA e UA-LIPO.

Le MIC di UA e UA-LIPO erano rispettivamente di 6,5 e 5,8 $\mu\text{g/mL}$. L'MBC di UA-LIPO era due volte più basso (16 $\mu\text{g/mL}$) di quello di UA (32 $\mu\text{g/mL}$). È stato inoltre riscontrato un miglioramento nell'assorbimento intracellulare di UA-LIPO, rispetto a UA. Inoltre, UA-LIPO permane molto più a lungo all'interno dei macrofagi (30 ore).

Tutti i dati ottenuti dall'incapsulamento dell'acido usnico nei liposomi come sistema di somministrazione di farmaci indicano una forte interazione tra UA-liposomi e macrofagi J774, facilitando così la penetrazione dell'acido usnico nelle cellule. Per questo motivo si ritiene che l'associazione di acido usnico con questo sistema di trasporto porti a un miglioramento della sua attività anti-micobatterica contro *M. tuberculosis*.

Ferraz-Carvalho *et al.* (2016) hanno studiato l'effetto dell'incapsulamento di acido usnico nei liposomi (Lipo-UA) in combinazione con rifampicina (Rif) e isoniazide (INH) contro gli isolati clinici di Multi TB-Resistant Drug (MDR-TB).

La tubercolosi (TB) è un'infezione batterica cronica causata da un microrganismo noto come *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Il trattamento si basa su una combinazione di isoniazide (INH), rifampicina (RIF), etambutolo (EMB) e pirazinamide (PZA). Solitamente i pazienti con infezione da tubercolosi richiedono una terapia a lungo termine e il mancato rispetto dell'intero regime terapeutico può portare all'emergenza di Mtb multi ed estensiva resistenza ai farmaci (MDR-TB e XDR-TB). Nel 2010, solo il 48% dei pazienti affetti da MDR-TB in tutto il mondo è stato completamente trattato con successo con i farmaci anti-TB attualmente utilizzati (OMS 2013). Le opzioni terapeutiche per il trattamento della MDR TB sono PZA in concomitanza con farmaci di seconda linea come etionamide, protionamide, clofloserina, capreomicina, acido *p*-aminosalicilico o fluorochinoloni (Mukherjee *et al.* 2004).

I farmaci antitubercolari di seconda linea mostrano più tossicità, sono più costosi e meno potenti rispetto agli agenti di prima linea, c'è stato quindi un urgente bisogno di trovare nuovi farmaci efficaci, nuove forme di somministrazione di farmaci e combinazioni di agenti antitubercolari per il trattamento della tubercolosi.

È stato ampiamente dimostrato che l'incapsulamento dei liposomi può migliorare l'efficacia terapeutica di farmaci antimicrobici.

L'attività antimicrobica *in vitro* e *in vivo* di UA e UA incapsulati in liposomi contro Mtb era ben consolidata, ma la loro attività contro MDR-TB, così come le loro interazioni con RIF e INH, non erano ancora state indagate. Quindi, l'obiettivo di questo studio era valutare l'effetto dell'incapsulamento di UA nei liposomi (UA-Lipo) e le sue combinazioni con RIF o INH, contro isolati clinici MDR-TB.

I risultati sull'attività anti-micobatterica di UA, UA-Lipo e dei farmaci di riferimento contro gli isolati clinici MDR-TB sono riportati in Tabella 11.

La MIC di ogni ceppo Mtb a UA e UA-Lipo era di 31,25 $\mu\text{g/mL}$ e 0,98 $\mu\text{g/mL}$, rispettivamente mentre la MIC di INH e RIF variava tra i ceppi testati.

Tabella 11. Attività anti-micobatterica dei composti testati contro *Mycobacterium tuberculosis* in isolati clinici

<i>M. tuberculosis</i> strains	MIC ($\mu\text{g/mL}$)			
	INH	RIF	UA	UA-Lipo
H37Rv	< 0.25	< 0.12	31.25	0.98
1412	≥ 16	4	31.25	0.98
1619	16	8	31.25	0.98
0729	≥ 16	≥ 8	31.25	0.98
1411	16	8	31.25	0.98
1409	4	≥ 8	31.25	0.98
1484	≥ 16	≥ 8	31.25	0.98

H37Rv: virulent strains; INH: isoniazid; MIC: minimum inhibitory concentration; RIF: rifampicin; UA: usnic acid; UA-Lipo: usnic acid encapsulated into liposomes.

Le interazioni *in vitro* sono state valutate in due isolati MDR-TB (1619 e 1411). I risultati dell'interazione di UA e UA-Lipo con INH e RIF contro gli isolati MDR-TB sono mostrati in Tabella 12.

Tabella 12. Effetti dell'acido usnico o UA-Lipo in combinazione con isoniazide o rifampicina contro gli isolati clinici MDR

Combination	MDR-TB clinical isolates	MIC in combination ($\mu\text{g/mL}$)				FICI	Interaction
		UA	UA-Lipo	INH	RIF		
UA/INH	1619	31.25	-	4	-	1.30	Indifferent
	1411	62.5	-	16	-	2.50	Indifferent
UA-Lipo/INH	1619	-	0.98	16	-	2.00	Indifferent
	1411	-	62.5	4	-	2.25	Indifferent
UA/RIF	1619	7.81	-	-	0.5	0.31	Synergistic
	1411	7.81	-	-	1	0.38	Synergistic
UA-Lipo/RIF	1619	-	0.122	-	1	0.25	Synergistic
	1411	-	0.245	-	0.25	0.28	Synergistic

FICI: fractional inhibitory concentration index; INH: isoniazid; MDR-TB: multidrug-resistant *M. tuberculosis*; MIC: minimum inhibitory concentration; RIF: rifampicin; UA-Lipo: usnic acid encapsulated into liposomes.

Sono state valutate le interazioni *in vitro* tra RIF o INH e UA o UA-Lipo.

I dati sono stati analizzati dopo aver calcolato l'indice di concentrazione inibitoria frazionaria (FICI) come segue:

$$\sum \text{FICI} = \text{FIC A} + \text{FIC B} = \text{MIC AB} / \text{MIC A} + \text{MIC BA} / \text{MIC B}$$

Dove:

- MIC AB è uguale al MIC del farmaco A in combinazione con il farmaco B;
- MIC A è il MIC del solo farmaco A;
- MIC BA è uguale alla MIC del farmaco B in combinazione con farmaco A;
- MIC B è la MIC del solo farmaco B.

L'interazione è considerata sinergica per $FICI < 0,5$; additivo con valori $0,5 \leq FICI \leq 1$; indifferente $1 < FICI \leq 4$ e antagonista con $FICI > 4$. Il FICI (indice di concentrazione frazionaria inibitoria) delle combinazioni UA/INH e UA-Lipo/INH variava da 1,30-2,5, quindi senza differenze di rilievo. Tuttavia, le combinazioni di UA/RIF e UA-Lipo/RIF hanno mostrato un effetto sinergico con valori di $FICI < 0,5$: 0,31 per UA/RIF e 0,28 per UA-Lipo/RIF.

Pertanto, gli autori hanno concluso che i liposomi caricati con UA potrebbero essere utilizzati per ottimizzare l'attività antimicobatterica della rifampicina, farmaco di prima linea usato per curare la tubercolosi.

In uno studio (Francolini *et al.*, 2019) gli autori sono partiti dal presupposto che l'inclusione di UA in idonei nanocarrier come i liposomi cationici potesse aumentare la sua disponibilità in acqua consentendo un controllo della sua farmacocinetica e biodistribuzione e riducendo i suoi effetti collaterali, e che inoltre la presenza di porzioni glicosidiche sulla superficie dei liposomi potesse promuovere ulteriormente l'accumulo di UA nei tessuti bersaglio aumentando così l'efficacia del trattamento.

Le formulazioni di liposomi esaminate erano composte da un fosfolipide insaturo, 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfolcolina (DOPC), colesterolo (col) e uno dei tre glucosilati anfifili (GA) presenti in Figura 19.

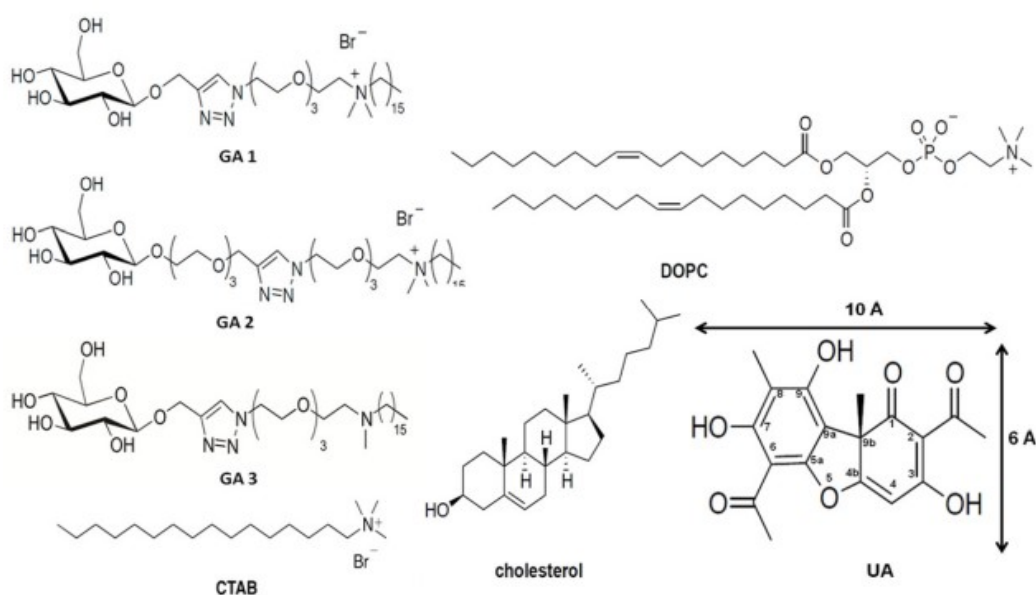


Figura 19. Struttura molecolare dei componenti dei liposomi

I GA 1 e 2 differiscono per la lunghezza del distanziatore idrofilo che collega il residuo di glucosio al gruppo ammonico quaternario, mentre GA3 è l'analogo di GA1 sensibile al pH neutro.

La lunghezza del distanziatore poliossietilenico attraverso il quale un ligando specifico è attaccato alla superficie del liposoma può essere un parametro cruciale nel determinare la capacità di interazione del nanocarrier alle cellule bersaglio batteriche o cancerose.

L'attività di liposomi glucosilati caricati con acido usnico è stata testata contro *Staphylococcus epidermidis*. L'UA fornito dai liposomi glucosilati rappresenta un candidato promettente per questo scopo. I liposomi glucosilati cationici aumentano sicuramente la biodisponibilità di UA

contro i microrganismi, comportando così una significativa riduzione della concentrazione attiva del farmaco.

I risultati ottenuti indicano il grande potenziale di queste formulazioni per il trattamento delle infezioni batteriche, un problema di primaria importanza nell'era della resistenza agli antibiotici. Infatti, altri principi attivi potrebbero essere caricati su questi vettori lipidici ed essere efficientemente indirizzati alle cellule batteriche.

Un altro approccio descritto in letteratura è dato dalla complessazione dell'acido usnico con le ciclodestrine e l'incapsulamento dei complessi di inclusione in liposomi, con l'obiettivo di sviluppare sistemi per migliorare le proprietà antimicrobiche dell'acido usnico (Lira *et al.* 2009a).

La complessazione dell'acido usnico con la β -ciclodestrina ha aumentato la sua solubilità in acqua senza influenzare la sua attività antimicrobica.

È stata valutata l'attività antimicrobica di UA: β -CD contro tre diversi microrganismi per studiare l'effetto della complessazione con β -ciclodestrina sull'attività dell'acido usnico. È stata testata l'attività antimicrobica dell'acido usnico su *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Enterococcus faecalis* (ATCC 14 508) e *Actinobacillus actinomycetecomitans* (Y4-FDC, dalla collezione del Federal Università di Rio de Janeiro, Brasile), utilizzando il metodo di diffusione del disco in agar. Un campione di UA: β -CD (3 mg) è stato solubilizzato in acqua sterile per ottenere 25, 50 e 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ di concentrazione dei farmaci. Acido usnico disciolto in DMSO (75 $\mu\text{g}/\text{mL}$) è stato utilizzato come controllo positivo. DMSO e le soluzioni di β CD sono state utilizzate come controlli negativi.

I dischi con soluzioni campione sono stati posti sulla superficie di piastre Petri contenenti terreno di coltura inoculato con il microrganismo. I campioni sono stati testati su colture dei seguenti microrganismi: *E. faecalis* su terreno agar, *S. mutans* su Mitis Salivarius agar e *A. actinomycetecomitans* su agar sangue. Sono stati determinati i diametri delle zone inibitorie dopo 24 h di incubazione. I diametri della zona inibitoria per il complesso binario e acido usnico libero (75 $\mu\text{g}/\text{mL}$) erano rispettivamente: $11 \pm 1,0$ mm e $11,33 \pm 0,5$ mm per *S. mutans*, $13,33 \pm 1,1$ mm e $12,66 \pm 2,3$ mm per *E. faecalis* e $11,33 \pm 0,5$ mm e $12,33 \pm 2,5$ mm per *A. actinomycetecomitans*.

Questi risultati hanno mostrato che non si erano verificate significative differenze nell'attività antimicrobica tra acido usnico libero e UA: β -CD, indicando che l'attività dell'acido usnico è stata preservata dopo la formazione del complesso di inclusione. Il processo di inclusione, quindi, non interferisce con l'attività antimicrobica del farmaco.

Come mostrato in Tabella 13, l'acido usnico (600 $\mu\text{g}/\text{mL}$) è risultato efficace contro ceppi di MRSA *S. aureus* (clone pediatrico brasiliano AM 793 e clone pediatrico AM942), mentre UA-lipo (Tabella 14) era più efficace a concentrazioni più elevate (1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$), UA: β -CD-lipo era inefficace contro Ceppi di MRSA *S. aureus* (Tabella 15) anche a concentrazioni più elevate di UA (1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Tabella 13. Attività antimicrobica dell'acido usnico contro MRSA *Staphylococcus aureus* mostrato come zona di inibizione (mm).

Samples ($\mu\text{g/mL}$)	<i>S. aureus</i> AM 103 ATCC 6538	<i>S. aureus</i> AM 106 ATCC 6538P	<i>S. aureus</i> AM 632 MRSA	<i>S. aureus</i> AM 793 MRSA	<i>S. aureus</i> AM 942 MRSA
Tetraciclina (300)	33	36	32	14	15
UA (300)	13	13	14	13	14
UA (600)	13	13	14	14	15
UA (1200)	14	14	14	14	15

MRSA methicilin resistant *Staphylococcus aureus*, AM 793 Brazilian pediatric clone, AM942 pediatric clone

Tabella 14. Attività antimicrobica dell'acido usnico incapsulato nei liposomi (UA-lipo) contro MRSA *Staphylococcus aureus* mostrato come zona di inibizione (mm).

Samples ($\mu\text{g/mL}$)	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>S. aureus</i> ATCC 6538P	<i>S. aureus</i> AM 632 MRSA	<i>S. aureus</i> AM 793 MRSA	<i>S. aureus</i> AM 942 MRSA
Tetraciclina (300)	35	37	34	15	16
UA-lipo (300)	13	13	14	13	14
UA-lipo (600)	14	14	14	14	14
UA-lipo (1200)	15	13	14	15	15

MRSA methicilin resistant *Staphylococcus aureus*, AM 793 Brazilian pediatric clone, AM942 pediatric clone

Tabella 15. Attività antimicrobica di UA: β -CD caricato nei liposomi contro MRSA *Staphylococcus aureus* mostrato come zona di inibizione (mm).

Samples ($\mu\text{g/mL}$)	<i>S. aureus</i> AM 103 ATCC 6538	<i>S. aureus</i> AM 106 ATCC 6538P	<i>S. aureus</i> AM 632 MRSA	<i>S. aureus</i> AM 793 MRSA	<i>S. aureus</i> AM 942 MRSA
Tetraciclina (300)	34	36	34	15	16
UA: β -CD-lipo (300)	11	12	11	12	11
UA: β -CD-lipo (600)	11	12	12	12	12
UA: β -CD-lipo (1200)	12	12	12	13	12

MRSA Methicilin resistant *Staphylococcus aureus*, AM 793 Brazilian pediatric clone, AM942 Pediatric clone

Questi risultati possono essere spiegati dal tempo di incubazione e dal meccanismo di diffusione del farmaco dai liposomi.

Infatti, per il complesso UA: β -CD, incapsulato nella cavità interna dei liposomi, può essere richiesto un tempo di incubazione più lungo di 72 h (tempo preso in considerazione nello studio) per la diffusione del farmaco attraverso il doppio strato fosfolipidico dei liposomi e la conseguente diffusione attraverso la membrana dei batteri.

Inoltre tutti questi risultati hanno dimostrato che l'incapsulamento di UA nei liposomi ha conservato la sua attività antimicrobica.

La Figura 20 mostra il profilo cinetico *in vitro* dell'acido usnico rilasciato da tre diverse formulazioni: complesso di inclusione (UA: β -CD), liposomi carichi di acido usnico (UA-Lipo) e UA:complesso β -CD incorporato nei liposomi (UA: β -CD-Lipo).

UA: β -CD ha rilasciato il 50% di acido usnico in 3 h, corrispondente all'effetto di rilascio iniziale, seguito da un rilascio lineare con 80% a 11 h, raggiungendo 99,1% in 30 ore.

Il rilascio di acido usnico dai liposomi ha raggiunto il 30% entro 7 ore e il 55% in 24 ore, raggiungendo il 70% in 72 ore, mentre il rilascio di acido usnico dai liposomi carichi con UA: β -

CD è stato leggermente più lento (32,5% in 24 ore) rispetto ai liposomi carichi di acido usnico (50% a 20,5 h e 65% a 33 ore).

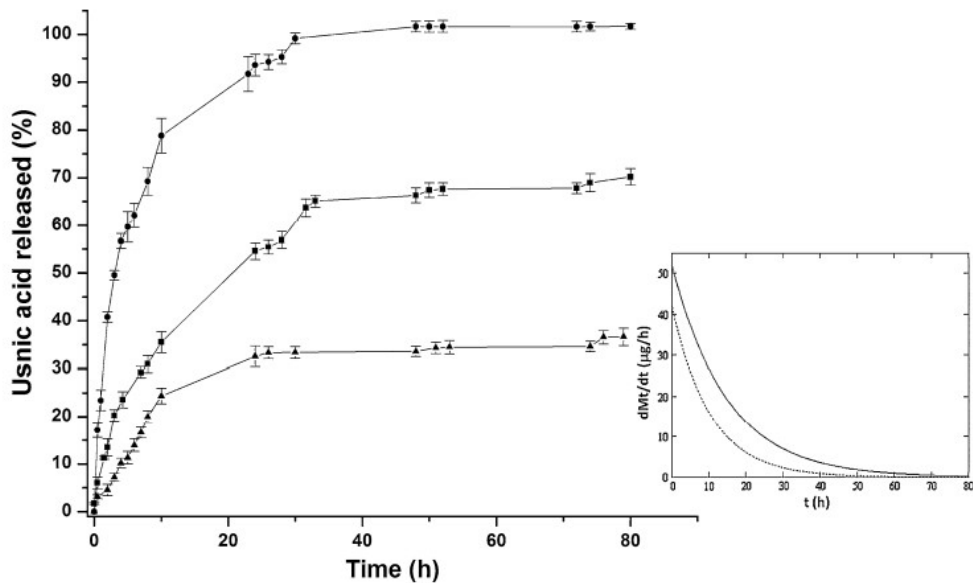


Figura 20. Profilo di rilascio in vitro dell'acido usnico da UA:βCD Lipo (▲), Ua-Lipo (■) e UA:βCD (●).

La diminuzione esponenziale della velocità di rilascio di acido usnico dalle formulazioni liposomiali è mostrata nell'insero della Figura 20.

La velocità di rilascio iniziale era di 52 $\mu\text{g/h}$ per i liposomi carichi di acido usnico e 41 $\mu\text{g/h}$ per UA:β - CD-liposomi.

Si può così verificare che la complessazione di acido usnico con β-ciclodestrina e il suo incapsulamento nei liposomi e l'incapsulamento nei liposomi di acido usnico libero, ha ridotto la velocità di rilascio del farmaco e la quantità di farmaco rilasciata, risulta infatti molto evidente la differenza della curva del farmaco non incapsulato.

Inoltre si è ottenuto un rilascio più lento dall'inclusione del farmaco come complesso UA:β-CD nei liposomi rispetto all'acido usnico libero caricato nei liposomi.

Gli autori hanno affermato che questo comportamento era dovuto alla complessazione del farmaco con la ciclodestrina nei liposomi e/o alla stabilizzazione della membrana liposomiale da parte della ciclodestrina.

La complessazione dell'acido usnico con la β -ciclodestrina offre un modo per migliorarne la solubilità e la biodisponibilità mantenendo l'attività antimicrobica.

L'incapsulazione riuscita del complesso dell'acido usnico nella cavità acquosa dei liposomi ha incoraggiato a intraprendere ulteriori studi sulla progettazione di sistemi di nanocarrier.

Alla luce di questi risultati, è stato quindi ritenuto che liposomi contenenti i complessi acido usnico:β-ciclodestrina sono stabili e ciò può portare ad ulteriori applicazioni in terapia.

Più recentemente, sono stati sviluppati altri nanosistemi contenenti acido usnico ad attività antimicrobica. Negli ultimi due decenni, le nanoparticelle di ossido di ferro superparamagnetiche (SPION) sono stati oggetto di intense ricerche in quanto considerati strumenti promettenti in diversi campi applicativi. Nel settore biomedico, SPION può essere utilizzato sia in diagnostica che in terapia. Infatti, le loro proprietà magnetiche intrinseche consentono loro di essere studiati

sia come agenti di contrasto nella risonanza magnetica che come nano-sistemi terapeutici nei trattamenti dell'ipertermia e targeting dei farmaci.

Per quanto riguarda il targeting dei farmaci, in linea di principio, SPION può essere trasportato per mezzo di campi magnetici esterni e fissato ad un'area bersaglio del corpo per ottenere una terapia sito-specifica con una migliore efficacia e per minimizzare gli effetti collaterali sistemici. SPION può anche consentire l'uso di farmaci con applicazioni terapeutiche limitate a causa di problemi di tossicità o proprietà fisico-chimiche sfavorevoli. Gli inconvenienti che possono limitare l'uso di SPION sono la possibile aggregazione indotta magneticamente, l'ossidazione superficiale e la mancanza di gruppi funzionali. Pertanto, la modifica della superficie di SPION è necessaria e di solito comporta il rivestimento con polimeri, tensioattivi o composti inorganici. La risultante struttura del nucleo/guscio può fornire una buona dispersione in acqua, una protezione contro l'ossidazione ed un efficiente carico di farmaci.

Diversi studi hanno valutato il potenziale uso di SPION nel trattamento del cancro per la somministrazione di farmaci in regimi terapeutici mirati.

Recentemente, sono stati proposti SPION anche per il trattamento delle infezioni microbiche correlate a dispositivi medici impiantabili. Queste infezioni sono localizzate nel sito di impianto del dispositivo e sono supportate dalla formazione sulle superfici del dispositivo di biofilm, altamente resistenti agli antibiotici. La localizzazione di SPION caricato con il farmaco nell'area infetta che circonda l'impianto del dispositivo dovrebbe essere in grado di potenziare l'attività del farmaco contro il biofilm. In effetti, gli SPION sono abbastanza piccoli da penetrare anche nella matrice del biofilm.

In particolare, SPION sembra possedere un'attività battericida intrinseca contro *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* ed *Escherichia coli*, grazie alla capacità di interagire e penetrare nella membrana cellulare batterica e di produrre radicali liberi.

SPION sono stati anche caricati con diverse classi di agenti antimicrobici, inclusi antibiotici e farmaci antimicotici. Per migliorare la carica antibiotica sono stati utilizzati per il rivestimento di SPION polimeri idrofili e funzionali. A questo proposito, le macromolecole cationiche sembrano essere le più interessanti per lo sviluppo di SPION carico di farmaci antimicrobici poiché non solo possiedono una attività antimicrobica intrinseca ma sono anche in grado di legarsi alla membrana cellulare del batterio caricato negativamente con un potenziale effetto positivo sull'assorbimento del farmaco da parte di microrganismi.

In uno studio condotto da Taresco *et al.* (2015) sono state utilizzate nanoparticelle magnetiche (MNP), che possiedono un core di ossido di ferro e manganese con un guscio polimerico per il caricamento di acido usnico.

Per ottenere MNP con diverse proprietà superficiali, sono stati studiati due rivestimenti polimerici: un poliacrilammide cationico antimicrobico idrofilico con un gruppo amminico terziario e policaprolattone di nuova sintesi idrofobico a forma di stella ramificata. Il primo polimero forniva una attività antimicrobica intrinseca e gruppi basici per l'assorbimento di UA mentre il secondo poteva interagire con UA mediante interazioni idrofobiche.

Tra i due rivestimenti polimerici, gli autori prevedevano che fosse il polimero cationico antimicrobico quello più vantaggioso in quanto in grado di agire in sinergia con l'acido usnico potenziando l'attività antimicrobica e prevenendo lo sviluppo di batteri resistenti ai farmaci. In effetti, gli MNP cationici si legano alla membrana cellulare batterica negativa provocando

un'alterazione di integrità della parete cellulare e favorendo la penetrazione del farmaco rilasciato nella membrana cellulare.

Gli MNP core/shell sviluppati sono stati caratterizzati in termini di dimensioni, morfologia e proprietà magnetiche. È stata inoltre valutata l'influenza dei due rivestimenti polimerici sul rilascio del farmaco e sull'attività antimicrobica *in vitro* rispetto a un ceppo di *Staphylococcus epidermidis*.

In questo studio, al fine di sviluppare sistemi di targeting per farmaci da essere impiegati per il trattamento di infezioni localizzate, gli MNP di ossidi di ferro e ossidi di manganese sono stati rivestiti con una poliacrilammide idrofila basica (pAcDED) o con un poli-ε-caprolattone idrofobo ramificato a stella (sbPCL50).

La finalità del lavoro era fornire agli MNP un corretto guscio polimerico in grado non solo di diminuire l'aggregazione ma anche di produrre una superficie ingegnerizzata che possedesse gruppi funzionali specifici e siti di legame per il caricamento del farmaco.

In questo caso, il poli-ε-caprolattone è stato scelto per la sua nota biocompatibilità e idrofobicità in grado di garantire una buona affinità per UA. La poliacrilammide basica idrofila pAcDED è stata scelta per l'attività antimicrobica intrinseca e la presenza di gruppi amminici terziari basici in grado di complessare UA.

Quest'ultimo polimero testato sulle normali cellule di fibroblasti cutanei umani ha dimostrato di non essere citotossico per 24 ore di incubazione a concentrazioni fino a 100 µg/mL (corrispondente alla MIC).

L'utilizzo di nanoparticelle come vettori per il targeting di farmaci aggiunge ulteriori vantaggi derivanti dalla ridotta dimensione del vettore che fornisce un lungo tempo di circolazione *in vivo*, una buona permeabilità nei tessuti e nelle cellule e un elevato carico di farmaco.

Tra i nanosistemi a rilascio mirato, le nanoparticelle magnetiche sono di grande interesse perché possono essere maneggiate e dirette a un'area specifica dell'organismo da un campo magnetico esterno.

Come si può osservare dai dati riportati in Tabella 16, le proprietà superficiali hanno influenzato significativamente il caricamento del farmaco.

Tabella 16. Quantità di acido usnico caricate e rilasciate da MNP non rivestiti e rivestiti con polimero

Sample	UA loading (mg _{UA} /mg _{MNPs})	UA released at 30 min (mg _{UA} /mg _{MNPs})	UA released at 60 min (mg _{UA} /mg _{MNPs})
MnFe ₂ O ₄	0.22 ± 0.04	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.01
sbPCL ₅₀ -MnFe ₂ O ₄	0.49 ± 0.07	0.09 ± 0.01	0.12 ± 0.04
pAcDED _{CL} -MnFe ₂ O ₄	0.48 ± 0.05	0.11 ± 0.04	0.21 ± 0.02
pAcDED-MnFe ₂ O ₄	0.62 ± 0.02	0.11 ± 0.03	0.14 ± 0.02

In particolare, gli MNP non rivestiti hanno assorbito una piccola quantità di farmaco rispetto agli MNP rivestiti. Sono stati raggiunti i carichi maggiori di farmaci da pAcDED-MnFe₂O₄ e pAcDEDCL-MnFe₂O₄, probabilmente a causa dell'instaurazione di una specifica interazione ionica tra i gruppi acidi di UA e gruppi amminici terziari polimerici.

Anche l'idrofilia di pAcDED ha contribuito ad aumentare il carico di farmaco, dato che il rigonfiamento del polimero può consentire la penetrazione dell'UA negli strati interni del guscio del polimero.

La quantità inferiore di farmaco adsorbita da pAcDEDCL-MnFe₂O₄ rispetto a pAcDED-MnFe₂O₄ è presumibilmente correlata alla minore capacità di rigonfiamento dovuta al cross linking del pAcDED.

In Figura 21 è riportato il rilascio di UA da MNP non rivestiti e rivestiti con polimero.

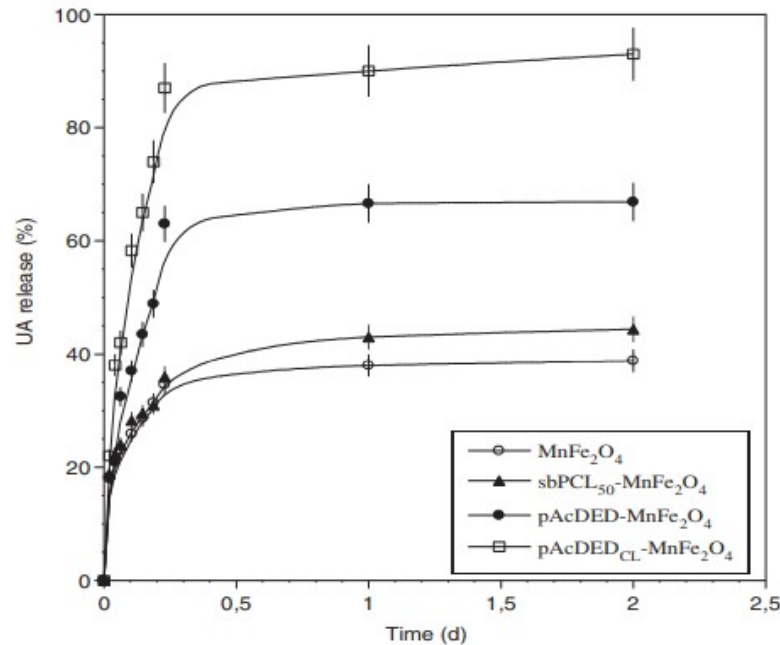


Figura 21. Rilascio di acido usnico da MNP non rivestiti e rivestiti con polimero

Come previsto, il tipo e la forza dell'interazione farmaco/polimero hanno influenzato significativamente il rilascio del farmaco. In particolare, tutti i sistemi hanno raggiunto il plateau in 24 h ma la percentuale di farmaco rilasciato all'equilibrio era significativamente diversa.

Il nanocomposto pAcDEDCL-MnFe₂O₄ ha rilasciato più del 90% di farmaco in 24 h confermando che l'assorbimento del farmaco si verifica principalmente sulla superficie del guscio polimerico. La quantità inferiore rilasciata in 24 h di UA (circa il 65%) da pAcDED-MnFe₂O₄ è probabilmente correlata a un rilascio controllato della diffusione esercitato dal guscio polimerico e dalle interazioni acido-base UA/pAcDED. Infine, MnFe₂O₄ non rivestito e i nanocompositi sbPCL50-MnFe₂O₄ hanno mostrato il minor rilascio (ca. 40% in 24 h) che ha comunque suggerito una buona affinità di UA verso questi due composti idrofobici.

Per verificare il potenziale utilizzo *in vivo* dei sistemi sviluppati, è stata anche valutata la quantità di farmaco rilasciata a 30 e 60 minuti e i dati sono riportati in Tabella 16. Questo perché l'uso di MNP nel targeting dei farmaci comporta l'iniezione endovenosa di MNP nel paziente seguita dall'applicazione di un campo magnetico esterno per un periodo sufficientemente lungo di tempo, generalmente compreso tra 30 e 60 min, per concentrare gli MNP nel sito di destinazione. Pertanto, da un punto di vista pratico, è importante ottenere un rilascio prolungato durante i primi 30–60 min, che è approssimativamente il tempo di residenza degli MNP sul target.

Come si può osservare in Tabella 16, i nanocomposti aventi un guscio di pAcDED danno luogo una quantità iniziale di farmaco a rilascio rapido a 30 e 60 min maggiore di entrambi gli MNP non rivestiti e sbPCL50-MnFe₂O₄. Il campione pAcDEDCL-MnFe₂O₄ ha rilasciato le quantità di farmaco più elevate a 60 min, rispettivamente 0,21 e 0,14 mg-UA/mg-MNP, suggerendo questi due sistemi come i più adatti per il targeting di farmaci.

Il pAcDED idrofilo ha prodotto il miglior rivestimento per MNP. In effetti, gli MNP rivestiti con pAcDED erano meno aggregati e mostravano una corretta proprietà magnetica, maggiore capacità di carico e rilascio di UA così come buone proprietà antimicrobiche.

In particolare, sia pAcDED-MnFe₂O₄ che pAcDEDCL-MnFe₂O₄, quest'ultimo con un guscio di pAcDED reticolato, sono stati in grado di rilasciare quantità significative di UA nella prima ora di rilascio (tra 0,14 e 0,2 mg-UA/mg-MNPs) e ha mostrato una MIC di 0,1 mg/mL. La buona attività antimicrobica di questi sistemi è anche correlata alle proprietà antimicrobiche intrinseche di pAcDED.

Anzi, presumibilmente la combinazione di due agenti antimicrobici ha contribuito a potenziare l'attività antimicrobica delle nanoparticelle. Questa strategia dovrebbe contribuire anche a prevenire lo sviluppo di batteri resistenti ai farmaci.

Gli MNP sviluppati caricati di farmaci potrebbero essere utilizzati sia per la prevenzione o per il trattamento di infezioni correlate ai dispositivi medici. Infatti, potrebbero essere iniettati nel paziente subito dopo l'impianto del dispositivo, per prevenire la formazione di biofilm, o, successivamente, in presenza di segni di infezione, per eliminare il biofilm formatosi sulla superficie del dispositivo.

Uno studio condotto da Alavi e Karimi (2019) aveva come scopo l'utilizzo di timolo e acido usnico, importanti metaboliti secondari rispettivamente di *Artemisia haussknechtii* e *Protoparmeliopsis muralis*, per la riduzione e la stabilizzazione di AgNO₃ e CuSO₄ in un processo di biosintesi di nanoparticelle metalliche (MNPs).

Gli effetti antibatterici di preparati di Ag-timolo (ATNPs), acido Ag-usnico (AUNPs), Cu-timolo (CTNPs) e acido Cu-usnico (CUNPs) su batteri multifarmaco-resistenti (MDR) incluso *Staphylococcus aureus* meticillina-resistente (MRSA) (Gram-positivo), *Acinetobacter baumannii* (A52) e *Klebsiella pneumonia* (K38) (Gram-negativo) sono stati confrontati con timolo, acido usnico, AgNO₃, CuSO₄ e tetraciclina.

Il gruppo carbonilico è stato individuato come principale gruppo funzionale nella stabilizzazione di ATNP e AUNP.

I risultati di questo studio hanno mostrato attività antibatteriche più elevate di acido usnico CUNP, e CTNP rispetto agli ATNP e agli AUNP contro i batteri MRSA.

L'incapsulamento UA nei nanosistemi offre nuove prospettive per il suo impiego nelle più svariati approcci terapeutici, fornendo un miglioramento significativo della sua azione. In Tabella 17 è riportata una rassegna di brevetti che descrivono l'uso delle nanotecnologie per il trasporto dell'acido usnico nelle sue diverse applicazioni (Tabella 17).

Tabella 17. Brevetti sui nanosistemi depositati presso l'Ufficio brevetti e marchi degli Stati Uniti (USPTO)

Pat. no.	Title
US 10,610,104 B2	Gastrointestinal tract detection methods, devices and systems
US 10,161,929 B2	Theragnostic platform and methods of use
US 10,144,759 B2	Nuclear sulfated oxysterol, potent regulator of lipid homeostasis, for therapy of hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, fatty liver diseases, and atherosclerosis
US 9,669,012 B2	Delivery systems
US 9,387,206 B2	Therapeutic approaches for treating Alzheimer's disease
US 9,433,569 B2	Dental care products comprising carbonate-substituted fluorohydroxy-apatite particles
US 9,408,791 B2	Oral care and oral hygiene products having photocatalytic activity comprising inorganic particles superficially functionalized with TiO ₂ nanoparticles
US 9,469,616 B2	Cyclic compounds and methods of making and using the same
US 9,211,238 B2	Carrier system for the transport of active substances into the skin
US 8,975,262 B2	Synthetic mimetics of host defense and uses thereof
US 9,127,233 B2	Device and method for solubilizing, separating, removing and reacting carboxylic acids in oils, fats, aqueous or organic solutions by means of micro-or nanoemulsification
US 9,211,259 B2	Antibiotic kit and composition and uses thereof
US 8,809,302 B2	Therapeutic approaches for treating Alzheimer's disease
US 8,734,855 B2	Slow release magnesium composition and uses thereof
US 8,895,561 B2	Compounds and methods for treating candidiasis and aspergillus infections
US 8,563,603 B2	Polycyclic compounds and methods related thereto
US 8,367,043 B2	Biologically active nanoparticles a carbonate-substituted hydroxyapatite, process for their preparation and compositions incorporating the same
US 8,377,473 B2	Slow release magnesium composition and uses thereof
US 8,486,374 B2	Hydrophilic, non-aqueous pharmaceutical carriers and compositions and uses
US 8,278,309 B2	Synthetic mimetics of host defense and uses thereof
US 7,993,630 B2	Protection of skin from UV and peroxide
US 7,635,722 B2	Chemical induced intracellular hyperthermia
US 7,597,879 B2	Sunscreen safety and efficacy enhancement
US 7,351,739 B2	Bioactive compounds and methods of uses thereof
US 7,342,044 B2	Preservative blends containing quaternary ammonium compounds
US 6,946,427 B2	Preservative blends containing iodine containing compound

CONCLUSIONE

Tra i vari composti di origine naturale, l'acido usnico (UA) è uno dei più studiati. L'acido usnico presenta diverse attività farmacologiche, distinguendosi come agente antimicrobico, antitumorale, antivirale e antiparassitario. Sebbene siano state attribuite diverse proprietà terapeutiche all'acido usnico, sin dalla sua scoperta, la maggior parte delle pubblicazioni riguardano il suo potenziale antimicrobico e in particolare è stato segnalato il suo spettro d'azione contro ceppi microbici sempre più nuovi, specialmente quelli resistenti agli antibiotici tradizionali. Questa attività è stata valutata tramite molti studi, tra cui si ricorda quello condotto da Elo *et al.* (2007) sugli effetti dell'acido (+)-usnico e dell'acido (+)-usnico sale sodico diidrato (usnato di sodio) contro isolati clinici di VRE (sia *Enterococcus faecalis* che *Enterococcus faecium*) e MRSA.

Molti studi hanno avuto anche come focus la capacità dell'acido usnico di agire contro i microrganismi che formano biofilm sui dispositivi medici. In questo contesto si inserisce lo studio condotto da Francolini *et al.* (2004) che aveva come punto di partenza la consapevolezza che i microrganismi potessero colonizzare un'ampia varietà di dispositivi medici, mettendo i pazienti a rischio di infezioni locali e sistemiche, comprese infezioni nel sito di impianto.

L'acido usnico ha dimostrato però di essere anche un ottimo agente antivirale come si evince dallo studio condotto da Sokolov *et al.* (2009) nel quale è stata studiata per la prima volta l'attività antivirale dell'acido usnico e dei suoi derivati contro il virus dell'influenza pandemica A (H1N1) usando cellule MDCK e i risultati hanno evidenziato che queste molecole sono sostanze antinfluenzali.

È stata inoltre indagata l'attività antiparassitaria di UA, in particolare l'attività leishmanicida dell'acido usnico è stata dimostrata da Derici *et al.* (2018) contro *Leishmania major*, *Leishmania infantum* e *Leishmania tropica* nella loro forma promastigote. L'acido usnico ha ridotto la vitalità dei tre parassiti a diversi livelli in modo dose-dipendente rispetto ai controlli che non hanno avuto effetto.

Allo stesso tempo, un progressivo aumento delle pubblicazioni relative all'azione antitumorale ha descritto la proprietà di questo derivato del lichene, ipotizzando la sua applicazione contro i più diversi tipi di cancro. L'attività antitumorale risulta infatti essere l'altra principale proprietà dell'acido usnico ed è stata descritta per la prima volta nel carcinoma polmonare di Lewis da Kupchan e Kopperman (1975) e si sono poi susseguiti una serie di studi che hanno rivelato l'attività dell'acido usnico verso molte linee cellulari cancerose.

Molti autori hanno evidenziato altre importanti proprietà biologiche delle quale si pregia l'acido usnico in particolare l'attività gastroprotettiva, antinfiammatoria e antiossidante.

Nonostante queste rilevanti attività, l'acido usnico presenta delle problematiche date soprattutto dalla sua scarsa solubilità in acqua e dalla intrinseca tossicità, in particolare l'epatotossicità, la quale è stata al centro di numerosi studi (Pramyothin *et al.* 2004). Epatotossicità che è risultata essere marcata anche nei soggetti che avevano assunto acido usnico come integratore alimentare (Durazo *et al.* 2004, Sanchez *et al.* 2006). I meccanismi proposti per il danno epatico correlato all'acido usnico includono il disaccoppiamento e inibizione della fosforilazione ossidativa, l'aumento dello stress ossidativo, la perossidazione lipidica e l'esaurimento del glutathione (GSH). L'interruzione della funzione respiratoria mitocondriale e lo

stress ossidativo vanno a minare la vitalità cellulare. Sembra quindi che l'interruzione della funzione mitocondriale sia il meccanismo generale che sta alla base della tossicità d'organo.

L'influenza dell'acido usnico sulla respirazione cellulare è stata citata per la prima volta da Johnson *et al.* (1950), che hanno studiato il disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa su rene e fegato di ratto; questo meccanismo d'azione è stato poi confermato da diversi studi (*in silico*, *in vitro* e *in vivo*) e da analisi biochimica, istopatologica, genomica e proteomica.

Le limitazioni alla sua applicazione terapeutica, come epatotossicità, bassa solubilità in acqua e di conseguenza ridotta efficacia, hanno guidato lo sviluppo di alternative innovative, come il suo incapsulamento in sistemi a rilascio controllato, importante strumento della nanotecnologia farmaceutica. Questi sistemi consentono il rilascio del principio attivo a velocità di resa ottimale e riduzione del regime posologico. Di conseguenza, sono in grado di aumentare l'efficacia terapeutica riducendo al minimo gli effetti collaterali e numerosi studi hanno evidenziato che nonostante l'incapsulamento sono comunque state mantenute le proprietà biologiche dell'acido usnico.

Sono state studiate varie forme di incapsulamento, tra cui l'incapsulamento dell'acido usnico in microsfeere formate da copolimero di acido lattico e acido glicolico (PLGA) (Ribeiro-Costa *et al.* 2004), il caricamento dell'acido usnico in liposomi la cui attività è stata valutata rispetto all'acido usnico libero sui macrofagi J774 (Lira *et al.* 2009) e l'incapsulamento di acido usnico nei liposomi Lipo-UA in combinazione con rifampicina (Rif) e isoniazide (INH) (Ferraz-Carvalho *et al.* 2016).

Più recentemente, sono stati sviluppati altri nanosistemi contenenti acido usnico per l'attività antimicrobica che offrono anche rilevanti strategie future per l'impiego di questo metabolita. Esempi includono nanoparticelle magnetiche (Taresco *et al.* 2015), nanoparticelle d'argento (Siddiqi *et al.* 2018) e microparticelle ad attività antibatterica (Martinelli *et al.* 2014)

I ricercatori hanno previsto un crescente interesse della comunità scientifica verso l'acido usnico che si sta già manifestando attraverso uno studio sempre più esteso delle proprietà e dell'applicazione di questo metabolita del lichene.

Questa tesi ha voluto approfondire lo stato dell'arte degli studi che trattano l'acido usnico, fornendo informazioni sulle sue proprietà chimiche, la sintesi e l'estrazione.

Sono state poi passate in rassegna le numerose proprietà biologiche, farmacologiche soffermandosi inoltre sulla sua intrinseca tossicità per gli umani e per gli animali con riferimento al meccanismo d'azione.

Si sono infine sottolineate le strategie per ridurre al minimo questi effetti tossici che hanno portato allo sviluppo di risorse biotecnologiche che ne consentono l'utilizzo e l'applicazione farmacologica.

BIBLIOGRAFIA

- Abo-Khatwa AN, Al-Robai AA, Al-Jawhari DA (2015) The uncoupling of oxidative phosphorylation of mouse-liver mitochondria in vivo by usnic acid. *JKAU* 17:35–45
- Alavi M, Karimi N (2019) Biosynthesis of Ag and Cu NPs by secondary metabolites of usnic acid and thymol with biological macromolecules aggregation and antibacterial activities against multi drug resistant (MDR) bacteria. *Int J Biol Macromol* 1:893–901. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.177>
- Araujo AAS, de Melo MGD, Rabelo TK, Nunes PS, Santos SL, Serafini MR, Santos MRV, Quintans-Ju'nior LJ, Gelain DP (2015) Review of the biological properties and toxicity of usnic acid. *Nat Prod Res.* <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1007455>
- Bazin MA, Lamer ACL, Delcros JG, Rouaud I, Uriac P, Boustie J, Corbel JC, Tomasi S (2008) Synthesis and cytotoxic activities of usnic acid derivatives. *Bioorg Med Chem* 16:6860–6866. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.05.069>
- Brisdelli F, Perilli M, Sellitri D, Piovano M, Garbarino JA, Nicoletti M, Bozzi A, Amicosante G, Celenza G (2013) Cytotoxic activity and antioxidant capacity of purified lichen metabolites: an in vitro study. *Phyther Res* 27:431–437. <https://doi.org/10.1002/ptr.4739>
- Bruno M, Trucchi B, Burlando B, Ranzato E, Martinotti S, Akkol EK, Su'ntar I, Keles H, Verotta L (2013) (+)-Usnic acid enamines with remarkable cicatrizing properties. *Bioorg Med Chem* 21:1834–1843. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.01.045>
- Cansaran D, Kahya D, Yurdakulol E, Atakol O (2006) Identification and quantitation of usnic acid from the lichen *Usnea* species of Anatolia and antimicrobial activity. *Z Naturforsch C J Biosci* 61:773–776. <https://doi.org/10.1515/znc-2006-11-1202>
- Cocchietto M, Skert N, Nimis PL, Sava G (2002) A review on usnic acid, an interesting natural compound. *Naturwis-senschaften* 89:137–146. <https://doi.org/10.1007/s00114-002-0305-3>
- D. C. S. Macedo . F. J. F. Almeida . M. S. O. Wanderley . M. S. Ferraz . N. P. S. Santos . A. M. Q. Lo'pez . N. S. Santos-Magalha'es . M. C. B. Lira-Nogueira, Usnic acid: from an ancient lichen derivative to promising biological and nanotechnology applicatiосn, *Phytochem Rev* (2021) 20:609–630 <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09717-1>
- Dailey RN, Montgomery DL, Ingram JT, Siemion R, Vasquez M, Raisbeck MF (2008) Toxicity of the lichen secondary metabolite (+)-usnic acid in domestic sheep. *Vet Pathol* 45:19–25. <https://doi.org/10.1354/vp.45-1-19>
- Derici MK, Cansaran-Duman D, Taylan-O'zkan A (2018) Usnic acid causes apoptotic-like death in *Leishmania major*, *L. infantum* and *L. tropica*. *3 Biotech* 8:384. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1409-6>
- Einarsdo'ttir E, Groeneweg J, Bjo'rnssdo'ttir GG, Harðardottir G, Omarsdo'ttir S, Ingo'lfssdo'ttir K, O'gmundssdo'ttir HM (2010) Cellular mechanisms of the anticancer effects of the lichen compound usnic acid. *Planta Med* 76(969–974):2010. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1240851>
- Ferraz-Carvalho RS, Pereira MA, Linhares LA, Lira-Nogueira MCB, Cavalcanti IMF, Santos-Magalha'es NS, Montenegro LML (2016) Effects of the encapsulation of usnic acid into liposomes and interactions with antituberculous agents against multidrug-

resistant tuberculosis clinical isolates. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 111:330–334. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150454>

- Francolini I, Giansanti L, Piozzi A, Altieri B, Mauceri A, Mancini G (2019b) Glucosylated liposomes as drug delivery systems of usnic acid to address bacterial infections. *Colloids Surf B Biointerfaces* 1:632–638. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.05.056>
- Guo S-Y, Liu W-X, Han L-F, Chen JZ (2017) Antifungal activity of lichen extracts and usnic acid for controlling the saprolegniasis. *Int J Environ Agric Res* 3(5):43–47. <https://doi.org/10.25125/agriculture-journal-IJOEAR-APR-2017-35>
- Hawranik DJ, Anderson KS, Simmonds R, Sorensen JL (2009) The chemoenzymatic synthesis of usnic acid. *Bioorg Med Chem Lett* 19:2381–2383. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.03.087>
- Ingo'lfssdo'ttir K (2002) Usnic acid. *Phytochemistry* 61:729–736. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00383-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00383-7)
- Kristmundsdóttir T, Aradóttir HA, Ingo'lfssdo'ttir K, Ógmundsdóttir HM (2002) Solubilization of lichen metabolite (+)- usnic acid for testing in tissue culture. *J Pharm Pharmacol* 54:1447–1452. <https://doi.org/10.1211/002235702225>
- Lira MCB, Ferraz MS, Da Silva DGVC, Cortes ME, Teixeira KI, Caetano NP, Sinisterra RD, Ponchel G, Santos-Magalhães NS (2009a) Inclusion complex of usnic acid with β -cyclodextrin: characterization and nanoencapsulation into liposomes. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 64:215–224. <https://doi.org/10.1007/s10847-009-9554-5>
- Lira MCB, Siqueira M, Rolim-Santos HML, Galetti FCS, Simioni A, Santos NP, Egito EST, Silva CL, Tedesco AC, Santos-Magalhães NS (2009b) In vitro uptake and antimycobacterial activity of liposomal usnic acid formulation. *J Lipo Res* 19:49–58. <https://doi.org/10.1080/08982100802564628>
- Lu X, Zhao Q, Tian Y, Xiao S, Jin T, Fan X (2011) A Metabonomic characterization of (+)-usnic acid-induced liver injury by gas chromatography-mass spectrometrybased metabolic profiling of the plasma and liver in rat. *Int J Toxicol* 30:478–491. <https://doi.org/10.1177/1091581811414436>
- Luzina OA, Polovinka MP, Salakhutdinov NF, Tolstikov GA (2007) Chemical modification of usnic acid. *Russ Chem Bull* 56:1249–1251. <https://doi.org/10.1007/s11172-007-0189-7>
- Müller K (2001) Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. *Appl Microbiol Biotechnol* 56:9–16. <https://doi.org/10.1007/s002530100684>
- Nunes PS, Albuquerque-Júnior RLC, Cavalcante DRR, Dantas MDM, Cardoso JC, Bezerra MS, Souza JCC, Serafini MR, Quitans-Jr LJ, Bonjardim LR, Araújo AAS (2011) Collagen-based films containing liposome-loaded usnic acid as dressing for dermal burn healing. *J Biomed Biotechnol*. <https://doi.org/10.1155/2011/761593>
- Odabasoglu F, Cakir A, Suleyman H, Aslan A, Bayir Y, Halici M, Kazaz C (2006) Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *J Ethnopharmacol* 103:59–65. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.06.043>
- Pramyothin P, Janthasoot W, Pongnimitprasert N, Phrukudomc S, Ruangrunsi N (2004) Hepatotoxic effect of (+)-usnic acid from *Usnea siamensis* Wainio in rats, isolated rat

hepatocytes and isolated rat liver mitochondria. *J Ethnopharmacol* 90:381–387.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2003.10.019>

- Prokopiev IA, Filippov EV, Filippova GV, Gladkina NP (2017) Genotoxic effect of usnic acid enantiomers in vitro in human peripheral blood lymphocytes. *Tsitologiya* 59(1):13–18. <https://doi.org/10.1134/S1990519X17020031>
- Ribeiro-Costa RM, Alves AJ, Santos NP, Nascimento SC, Gonçalves ECP, Silva NH, Honda NK, Santos-Magalhães NS (2004) In vitro and in vivo properties of usnic acid encapsulated into PLGA-microspheres. *J Microencapsul* 21:371–384. <https://doi.org/10.1080/02652040410001673919>
- Sanchez W, Maple JT, Burgart LJ, Kamath PS (2006) Severe hepatotoxicity associated with use of a dietary supplement containing usnic acid. *Mayo Clin Proc* 81(4):541–544. <https://doi.org/10.4065/81.4.541>
- Santos NP, Nascimento SC, Silva JF, Pereira EC, Silva NH, Honda NK, Santos-Magalhães NS (2005) Usnic acid-loaded nanocapsules: an evaluation of cytotoxicity. *J Drug Deliv Sci Technol* 15(5):355–361. [https://doi.org/10.1016/S1773-2247\(05\)50065-0](https://doi.org/10.1016/S1773-2247(05)50065-0)
- Santos NPS, Nascimento SC, Wanderley MSO, Pontes-Filho NT, Silva JF, Castro CMMB, Pereira EC, Silva NH, Honda NK, Santos-Magalhães NS (2006) Nanoencapsulation of usnic acid: an attempt to improve antitumour activity and reduce hepatotoxicity. *Eur J Pharm Biopharm* 64:154–160. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2006.05.018>
- Sokolov DN, Zarubaev VV, Shtro AA, Polovinka MP, Luzina OA, Komarova NI, Salakhutdinov NF, Kiselev OI (2012b) Anti-viral activity of (-)- and (+)usnic acids and their derivatives against influenza virus A(H1N1). *Bioorg Med Chem Lett* 22:7060–7064. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.09.084>
- Taresco V, Francolini I, Padella F, Bellusci M, Boni A, Innocenti C, Martinelli A, D’Ilario L, Piozzi A (2015) Design and characterization of antimicrobial usnic acid loaded core/shell magnetic nanoparticles. *Sci Eng, Material*. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.03.044>