



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS
E SINTÉTICOS BIOATIVOS



ALÉXIA GONÇALVES DIAS

**CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS CONTENDO
NORFLOXAXINO E DERIVADO 2-AMINO-TIOFÊNICO VISANDO A
MODULAÇÃO DA RESISTÊNCIA ANTIBIÓTICA EM *STAPHYLOCOCCUS
AUREUS***

João Pessoa-PB

2025

ALÉXIA GONÇALVES DIAS

**CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS CONTENDO
NORFLOXAXINO E DERIVADO 2-AMINO-TIOFÊNICO VISANDO A
MODULAÇÃO DA RESISTÊNCIA ANTIBIÓTICA EM *STAPHYLOCOCCUS
AUREUS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

Área de concentração: Farmacoquímica.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Jaime Bezerra
Mendonça Junior

Coorientador: Prof. Dr. Elquio Eleamen Oliveira.

João Pessoa-PB

2025

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

D541c Dias, Aléxia Gonçalves.

Carreadores lipídicos nanoestruturados contendo norfloxaxino e derivado 2-amino-tiofênico visando a modulação da resistência antibiótica em *Staphylococcus aureus* / Aléxia Gonçalves Dias. – João Pessoa, 2025.
111 f. : il.

Orientação: Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior.

Coorientação: Elquio Eleamen Oliveira.

Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCS.

1. Farmacoquímica. 2. Resistência bacteriana. 3. Bomba de efluxo. 4. *Staphylococcus aureus*. 5. Nanopartículas lipídicas. 6. Derivado 2-aminotiofênico. I. Mendonça Junior, Francisco Jaime Bezerra. II. Oliveira, Elquio Eleamen. III. Título.

UFPB/BC

CDU 547.9(043)



Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências da Saúde
Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos



Ata da 514ª (quingentésima décima quarta) Dissertação de Mestrado do(a) aluno(a) do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos **Aléxia Gonçalves Dias**, candidato(a) ao Título de “Mestre” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacoquímica.

Às quatorze horas (14h00) do dia vinte e sete de fevereiro do ano de dois mil e vinte e cinco (27/02/2025), em ambiente virtual de videoconferência através do aplicativo Google Meet, link: <https://meet.google.com/nsg-nadr-ari>, reuniram-se em caráter de Solenidade Pública os membros da Comissão designada para examinar o(a) discente **Aléxia Gonçalves Dias**, candidato(a) ao Título de “MESTRE” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacoquímica. Foram componentes da Comissão Examinadora os pesquisadores Henrique Rodrigues Marcelino, Ph.D em Ciências da Saúde, Felipe Queiroga Sarmiento Guerra, Ph.D em Farmacologia, Elquio Eleamen Oliveira, Ph.D em Ciências da Saúde e Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior, Ph.D em Ciências Biológicas. Sendo o primeiro, integrante do corpo docente da Universidade Federal da Bahia; o segundo, integrante do corpo docente da Universidade Federal da Paraíba e os demais, integrantes do corpo docente da Universidade Estadual da Paraíba. Dando início aos trabalhos, o(a) Presidente da Comissão, professor(a) Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior, após declarar os objetivos da reunião, apresentou o(a) candidato(a) **Aléxia Gonçalves Dias**, a quem concedeu a palavra para que dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado “CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS CONTENDO NORFLOXAXINO E DERIVADO 2-AMINO-TIOFÊNICO VISANDO A MODULAÇÃO DA RESISTÊNCIA ANTIBIÓTICA EM STAPHYLOCOCCUS AUREUS”. Após discorrer sobre o referido tema durante cerca de quarenta minutos, o(a) candidato(a) foi arguido(a) pelos examinadores na forma regimental. Em seguida, passou a comissão, em caráter secreto, a proceder à avaliação e julgamento do trabalho, concluindo por atribuir-lhe o conceito APROVADO(A). Em face da aprovação, declarou o(a) Presidente achar-se o(a) examinado(a) **Aléxia Gonçalves Dias** legalmente habilitado(a) a receber o Título de “MESTRE” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, na área de concentração Farmacoquímica, cabendo a Universidade Federal da Paraíba, providências, como de direito, a expedição do Diploma que o(a) mesmo(a) faz jus. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da Comissão e pelo(a) discente.

Prof. Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior (Orientador)



Documento assinado digitalmente
FRANCISCO JAIME BEZERRA MENDONÇA JUNIOR
Data: 28/02/2025 15:44:04-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Elquio Eleamen Oliveira (Coorientador)

Prof. Dr. Henrique Rodrigues Marcelino (Examinador)



Documento assinado digitalmente
HENRIQUE RODRIGUES MARCELINO
Data: 27/02/2025 17:31:20-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Felipe Queiroga Sarmiento Guerra (Examinador)



Documento assinado digitalmente
FELIPE QUEIROGA SARMENTO GUERRA
Data: 28/02/2025 13:33:49-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Aléxia Gonçalves Dias (Discente)



Documento assinado digitalmente
ALEXIA GONCALVES DIAS
Data: 28/02/2025 16:43:51-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>



Documento assinado digitalmente
ELQUIO ELEAMEN OLIVEIRA
Data: 28/02/2025 16:25:52-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

ALÉXIA GONÇALVES DIAS

Carreadores lipídicos nanoestruturados contendo norfloxacino e derivado 2-amino-tiofênico visando a modulação da resistência antibiótica em *Staphylococcus aureus*

Aprovada em: 27/02/2025

Banca Examinadora

Prof. Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Júnior

(Universidade Estadual da Paraíba)

Orientador / Presidente da Banca

Prof. Dr. Felipe Queiroga Sarmiento Guerra

Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Henrique Rodrigues Marcelino

Universidade Federal da Bahia

*Dedico esta dissertação à memória de meu
avô querido, Martins Gonçalves, um
homem de muita fé e perseverança*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, pela capacidade, força e mansidão para seguir em frente nos momentos em que, sozinha, eu não conseguiria prosseguir. Pela sua bondade e amor infinito em todos os momentos.

Aos meus pais, **Alexandre e Alessandra Dias da Silva**, por todo auxílio e pelas abdições que me permitiram seguir os meus sonhos. Obrigada por serem meu porto seguro nos tempos incertos, pelo exemplo de uma fé inabalável e por me mostrarem o lado feliz da vida, apesar de tudo.

Aos meus avós queridos, **Maria Teresa, Maria da Penha e Martins Gonçalves** (*in memoriam*), por todas as orações e por sempre torcerem por mim. Em especial ao meu avô, que partiu para os braços do Pai durante o desenvolvimento deste trabalho, mas que, em vida, sempre me auxiliou à sua maneira.

A todos os meus familiares, por se fazerem presentes, mesmo à distância, em todos os momentos da minha vida. Em especial, minhas primas-irmãs **Wendy Mary e Amanda Keller** e às minhas sobrinhas, as princesas **Maitê e Yasmin de Souza**, que sempre iluminam meu caminho.

Ao meu companheiro de todos os momentos, **Paulo Matheus Medeiros**, muito obrigada por segurar minha mão nos momentos em que achei que não seria possível seguir em frente. Agradeço por sempre ser uma solução em minha vida. Você é um instrumento do Espírito Santo em minha jornada.

Ao meu orientador, **Professor Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Júnior**, por ter, primeiramente, me aceitado como aluna e por toda a ajuda ao longo desta jornada. Agradeço por sempre ter um olhar sensível para me orientar e por ir até a bancada comigo, me ensinando a sintetizar o 6CN-Etil, por seus ensinamentos, pela confiança e calma que sempre me transmitiu.

Ao meu coorientador, **Professor Dr. Elquio Eleamen Oliveira**, meu professor desde a graduação, mas com quem tive a oportunidade de desenvolver um maior vínculo acadêmico durante o mestrado. Foi por meio do professor que descobri a área da nanotecnologia, e tenho uma enorme gratidão por toda a ajuda, especialmente nos momentos em que a pesquisa parecia não avançar, e ele sempre trouxe uma solução.

Agradeço por, muitas vezes, segurar minhas mãos para me ensinar e por me transmitir a confiança de que eu poderia tirar dúvidas sobre qualquer coisa. Muito obrigada por tudo.

A todos os membros do Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas (LSVM), especialmente os que pude construir um vínculo além do meio acadêmico **Izabele de Souza, Janine Nunes, Vitória Bernardo, Carlos Alberto, Luciana Maia, Priscilla Fernandes, Malu Reis, Michelle Pedrosa, Adriana Alencar, Rodrigo Ribeiro, Ricardo Coutinho**, gratidão pelos momentos descontraídos e por me ajudarem quando precisei no desenvolvimento dessa pesquisa.

Aos meus amigos, **Izabele Araújo**, minha “duplinha” de experimentos e disciplinas, que sempre esteve disposta a me ajudar, sacrificando finais de semana e feriados para me auxiliar na validação. Sou grata por toda a sua ajuda e por todo o conhecimento compartilhado. À **Camila Mello**, minha eterna professora, que me apresentou ao mundo das nanopartículas. À **Vitória Gaspar e Luiz Henrique**, por compartilharem comigo muitos fardos ao longo das disciplinas e por estarem sempre presentes.

Aos meus líderes **Geyse e Tiago Nascimento** por serem dádivas enviadas por Deus em minha vida e por me auxiliarem sempre, a toda a Força Jovem Universal (FJU) minha gratidão por transformarem os meus dias, tornando-os mais leves e tranquilos.

À **Universidade Estadual da Paraíba**, em especial ao **LSVM** e à **Central Multiusuário de Análises e Caracterização Químico-Biológica (CM-ACQuimBio)**, pela infraestrutura e recursos essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

À **Universidade Federal da Paraíba**, em especial ao Programa de **Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PgPNSB)** por todo o ensinamento e corpo docente altamente qualificado, que foram essenciais para a minha formação.

À **Universidade Regional do Cariri**, especialmente o **Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular** e ao **Professor Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho** pela parceria firmada para o desenvolvimento do estudo da atividade potencializadora de antibiótico realizada nesse estudo, com a colaboração da **Dr. Cícera Datiane de Moraes e Priscilla Fernandes**.

À **Universidade Federal de Pernambuco**, em especial a **Central multiusuário do Departamento de Física** pela análise de difração de raios-x realizada.

Aos professores da banca examinadora **Dr. Henrique Rodrigues Marcelino** e **Dr. Felipe Queiroga Sarmiento Guerra**, por terem aceito o convite e pela disponibilidade em contribuir com a avaliação deste trabalho.

À **Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela concessão da bolsa (88887.873293/2023-00), que foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

“Tudo posso naquele que me fortalece”
(Filipenses 4:13)

RESUMO

A resistência bacteriana é um dos maiores desafios da saúde pública global, destacando a necessidade de novos agentes antibacterianos. Esse estudo teve como objetivo desenvolver carreadores lipídicos nanoestruturados contendo um inibidor de bomba de efluxo, o derivado tiofênico 6CN-Etil e norfloxacino, visando modular a sensibilidade a norfloxacino das cepas *Staphylococcus aureus* resistentes que superexpressam bombas de efluxo. O 6CN-Etil foi reobtido pela reação de gewald. Os carreadores lipídicos foram obtidos pelo método de emulsão a quente por sonicação e caracterizados quanto diâmetro das partículas (TMP), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (PZ), eficiência de encapsulação (EE%), difração de raios-x (DRX) e espectroscopia no infravermelho (FTIR), além disso, foi realizado um estudo de estabilidade a longo prazo. Foi validado um método de quantificação simultânea do 6CN-Etil e norfloxacino por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de acordo com as diretrizes do ICH (Q2) para os fármacos. A atividade potencializadora do antibiótico foi avaliada pela Concentração Inibitória Mínima (CIM). A formulação otimizada CLN (carreador sem fármaco) após a liofilização apresentou o TMP de $196,3 \pm 1,87$, PDI = $0,084 \pm 0,06$ e PZ = $-17,52 \pm 1,70$, após 90 dias mantiveram TMP = $232,3 \pm 3,21$, PDI = $0,271 \pm 0,09$ e PZ em $-25,11 \pm 0,47$, já nos carreadores contendo o norfloxacino e 6CN-Etil (CLN10NOR+106CN) após a liofilização apresentaram o TMP = $244,4 \pm 7,44$, PDI = $0,319 \pm 0,00$ e PZ = $-34,09 \pm 0,84$, no dia 90 apresentou TMP = $349,2 \pm 125,15$, mas com PDI = de $0,381 \pm 0,11$ e PZ = $-23,88 \pm 1,45$, atendendo ao esperado em relação a manutenção dos parâmetros e sem a presença de precipitados na formulação em comparação com a formulação em suspensão. A EE% apresentou um resultado de 99,50% para o 6CN-Etil e 90,91% para o norfloxacino. O DRX mostrou um grau de amorfização nos carreadores lipídicos corroborando que houve a encapsulação dos ativos, assim como na análise por FTIR os CLN10NOR+106CN não apresentaram picos relacionados os ativos indicando a encapsulação dos fármacos, um método analítico foi desenvolvido para a quantificação simultânea do 6CN-Etil e norfloxacino atendendo os critérios do ICH. A avaliação da atividade antimicrobiana do carreador lipídico nanoestruturado demonstrou que o CLN10NOR+106CN promoveu uma redução significativa ($P < 0,0001$) da CIM (CIM = $62,5 \mu\text{g/mL}$) em comparação com o grupo contendo a mistura física 6CN-Etil+norfloxacino (CIM = $125 \mu\text{g/mL}$), sendo eficiente em inibir a bomba de efluxo NorA, e modular a sensibilidade da cepa *S. aureus* 1199B ao norfloxacino. Resultado equivalente foi observado frente a cepa *S. aureus* K2068 onde se observou a CIM do CLN10NOR+106CN = $78,41 \mu\text{g/mL}$), versus CIM mistura física = $125 \mu\text{g/mL}$. Entretanto esse resultado foi ainda mais promissor, visto que a mistura física não encapsulada não foi capaz de inibir a bomba de efluxo MepA, e modular a sensibilidade a norfloxacino. Portanto, a incorporação do norfloxacino e do 6CN-Etil em um carreador lipídico nanoestruturado provou modular a atividade dos ativos frente as cepas *S aureus* resistentes, sendo uma abordagem promissora para modular a ação de antimicrobianos, sendo uma opção para combater a problemática da resistência bacteriana.

Palavras-chave: Resistência bacteriana; Bomba de efluxo; *Staphylococcus aureus*; Nanopartículas lipídicas; derivado 2-aminotiofênico.

ABSTRACT

Bacterial resistance is one of the greatest global public health challenges, highlighting the need for new antibacterial agents. This study aimed to develop nanostructured lipid carriers containing an efflux pump inhibitor, the thiophenic derivative 6CN-Ethyl, and norfloxacin, in order to modulate the sensitivity to norfloxacin of resistant *Staphylococcus aureus* strains that overexpress efflux pumps. 6CN-Ethyl was reobtained by the gewald reaction. The lipid carriers were obtained by the hot emulsion sonication method and characterized in terms of particle diameter (TMP), polydispersity index (PDI), zeta potential (PZ), encapsulation efficiency (EE%), X-ray diffraction (XRD) and infrared spectroscopy (FTIR), as well as a long-term stability study. A method for the simultaneous quantification of 6CN-Ethyl and norfloxacin by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was validated in accordance with the ICH guidelines (Q2) for the drugs. The potentiating activity of the antibiotic was assessed by the Minimum Inhibitory Concentration (MIC). The optimized CLN formulation (carrier without drug) after freeze-drying had a TMP of $196,3 \pm 1.87$, PDI = 0.084 ± 0.06 and PZ = -17.52 ± 1.70 , after 90 days it maintained a TMP = $232, 3 \pm 3.21$, PDI = 0.271 ± 0.09 and PZ at -25.11 ± 0.47 , while the carriers containing norfloxacin and 6CN-Ethyl (CLN10NOR+106CN) after lyophilization showed TMP = $244, 4 \pm 7.44$, PDI = 0.319 ± 0.00 and PZ = -34.09 ± 0.84 , on day 90 it showed TMP = $349,2 \pm 125.15$, but with PDI = 0.381 ± 0.11 and PZ = -23.88 ± 1.45 , meeting expectations in terms of maintaining parameters and without the presence of precipitates in the formulation compared to the formulation in suspension. The EE% showed a result of 99.50% for 6CN-Ethyl and 90.91% for norfloxacin. The XRD showed a degree of amorphization in the lipid carriers, corroborating that the active ingredients were encapsulated, and in the FTIR analysis the CLN10NOR+106CN did not show peaks related to the active ingredients, indicating the encapsulation of the drugs. A validated analytical method was developed for the simultaneous quantification of 6CN-Ethyl and norfloxacin, meeting the ICH criteria. The evaluation of the antimicrobial activity of the nanostructured lipid carrier showed that CLN10NOR+106CN promoted a significant reduction ($P < 0.0001$) in the MIC (MIC = $62.5 \mu\text{g/mL}$) compared to the group containing the physical mixture 6CN-Ethyl+norfloxacin (MIC = $125 \mu\text{g/mL}$), being efficient in inhibiting the NorA efflux pump, and modulating the sensitivity of the *S. aureus* 1199B strain to norfloxacin. aureus 1199B strain to norfloxacin. An equivalent result was observed against the *S. aureus* K2068 strain, where the MIC of CLN10NOR+106CN = $78.41 \mu\text{g/mL}$), versus the MIC of the physical mixture = $125 \mu\text{g/mL}$. However, this result was even more promising, since the non-encapsulated physical mixture was unable to inhibit the MepA efflux pump and modulate sensitivity to norfloxacin. Therefore, the incorporation of norfloxacin and 6CN-Ethyl into a nanostructured lipid carrier proved to modulate the activity of the active ingredients against resistant *S aureus* strains, making it a promising approach for modulating the action of antimicrobials and an option for combating the problem of bacterial resistance.

Keywords: Bacterial resistance; Efflux pumps; *Staphylococcus aureus*; Lipid nanoparticles; 2-amino thiophene derivatives.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismos de resistência antimicrobianos.....	24
Figura 2: Principais famílias de bombas de efluxo	27
Figura 3: Mecanismo de inibição de bomba de efluxo	29
Figura 4: Estrutura química do norfloxacinó	31
Figura 5: Estrutura química 6CN-Etil	32
Figura 6: Nanopartícula lipídica sólida	34
Figura 7: Tipos de carreadores lipídicos nanoestruturados.....	36
Figura 8: Técnica de sonicação por fusão a quente.....	38
Figura 9: Estrutura química do ácido esteárico e ácido oleico.....	41
Figura 10: Método indireto para avaliação da eficiência de encapsulação	50
Figura 11: Triagem de lipídios líquidos do 6CN-Etil	56
Figura 12: Triagem de lipídios líquidos do Norfloxacinó.....	59
Figura 13: Espectro de infravermelho ácido oleico	67
Figura 14: Espectro de infravermelho ácido esteárico	68
Figura 15: Espectro de infravermelho PVA.....	68
Figura 16: Espectro de infravermelho 6CN-Etil	69
Figura 17: Espectro de infravermelho Norfloxacinó.....	70
Figura 18: Espectro de infravermelho CLN	70
Figura 19: Espectro de infravermelho CLN10NOR+106CN.....	71
Figura 20: Difratoograma Norfloxacinó	72
Figura 21: Difratoograma 6CN-Etil	72
Figura 22: Difratoograma CLN.....	73
Figura 23: Difratoograma CLN10Nor+106CN.....	73
Figura 24: Sobrenadante dos CLN	80
Figura 25: CLN branca com adição das soluções padrão do norfloxacinó e 6CN-Etil	79
Figura 26: Cromatograma Norfloxacinó e 6CN-Etil.....	79
Figura 27: Linearidade Norfloxacinó	82
Figura 28: Linearidade 6CN-Etil	82
Figura 29: Análise da distribuição normal dos resíduos para a concentração resposta do Norfloxacinó	86
Figura 30: Análise da distribuição normal dos resíduos para a concentração resposta do 6CN-Etil	85
Figura 31: Concentração inibitória mínima <i>S. aureus</i> 1199B	91
Figura 32: Concentração inibitória mínima <i>S. aureus</i> K2068	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação das fluoroquinolonas	30
Tabela 2: Formulações com variações em proporções e estabilizantes	47
Tabela 3: Formulações com variações nas proporções lipídica	48
Tabela 4: Formulações com variações na amplitude e tempo de sonicação.....	49
Tabela 5: Formulações com concentrações diferentes de lecitina.....	50
Tabela 7: Condições cromatográficas	51
Tabela 8: Parâmetros escolhidos para a robustez	55
Tabela 9: Diâmetro das partículas e índice de polidispersão de formulações com diferentes estabilizantes.....	60
Tabela 10: Diâmetro das partículas e índice de polidispersão de formulações com diferentes proporções de ácido esteárico:ácido oleico	60
Tabela 11: Diâmetro das partículas e índice de polidispersão de formulações variando o tempo e a potência de sonicação.....	63
Tabela 12: Diâmetro das partículas e índice de polidispersão das formulações variando a concentração de lecitina.....	64
Tabela 13: Diâmetro das partículas e índice de polidispersão de formulações variando a concentração do Norfloxacino e 6CN-Etil	66
Tabela 14: Diâmetro das partículas, índice de polidispersão e tempo de ressuspensão dos CLN Antes e Após a Liofilização com a Adição de Trealose	67
Tabela 15: Diâmetro das partículas, índice de polidispersão e tempo de ressuspensão dos CLN10NOR+106CN antes e após a liofilização com a adição de trealose.....	68
Tabela 16: Estudo de estabilidade 90 dias carreadores lipídicos nanoestruturados sem fármacos.....	77
Tabela 17: Estudo de estabilidade 90 dias carreadores lipídicos nanoestruturados contendo norfloxacino e 6CN-Etil.....	78
Tabela 18: Coeficientes de regressão linear do Norfloxacino.....	83
Tabela 19: Coeficientes de regressão linear do 6CN-Etil	83
Tabela 20: DPR% das concentrações da linearidade Norfloxacino	84
Tabela 21: DPR% das concentrações da linearidade 6CN-Etil.....	84
Tabela 22: Análise estatística dos coeficientes do modelo de regressão Linear-IC-95% do Norfloxacino.....	84
Tabela 23: Análise estatística dos coeficientes do modelo de regressão Linear-IC-95% do 6CN-etil	85
Tabela 24: Teste F-ANOVA do Norfloxacino	85
Tabela 25: Teste F-ANOVA do 6CN-Etil.....	85
Tabela 26: Análise de resíduos e resíduos padronizados do Norfloxacino	86
Tabela 27: Análise de resíduos e resíduos padronizados do 6CN-Etil.....	86
Tabela 28: Repetibilidade (intra-dia) Norfloxacino	88
Tabela 29: Repetibilidade (intra-dia) 6CN-etil	88
Tabela 30: Precisão intermediária Norfloxacino.....	89
Tabela 31: Precisão intermediária 6CN-Etil	89
Tabela 32: Exatidão Norfloxacino	89
Tabela 33: Exatidão 6CN-Etil	89
Tabela 34: Robustez Norfloxacino.....	90
Tabela 35: Robustez 6CN-Etil	90

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- ACN – Acetonitrila
- ATR– Reflectância total atenuada
- ATP– Adenosina trifosfato
- AZT– Azitromicina modificada
- BHI– Brain Heart Infusion
- CCCP– Cianeto de carbono m-clorofenilhidrazona
- CLAE– Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- CIM– Concentração inibitória mínima
- CLN– Carreador lipídico nanoestruturado sem fármaco
- CLN10NOR+106CN– Carreador lipídico nanoestruturado com 10 mg de norfloxacino e 10 mg de 6CN-Etil
- CLN5NOR+56CN– Carreador lipídico nanoestruturado com 5 mg de norfloxacino e 5 mg de 6CN-etil
- CV%– Coeficiente de variação
- DLS– Espalhamento de luz dinâmico
- DNA– Ácido Desoxirribonucleico
- DPR%– Desvio padrão relativo
- DRX– Difração de raios X
- EE– Eficiência de encapsulamento
- ESKAPE– *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp*
- FDCLNs– Carreadores lipídicos nanoestruturados sem fármacos liofilizados
- FCLNNOR+6CN– Carreadores lipídicos nanoestruturados contendo 10mg de 6CN-etil e 10mg de norfloxacino liofilizados
- FTIR– Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
- ICH– International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use
- LOD– Limite de detecção
- LOQ– Limite de quantificação
- MDR– Resistência a multidrogas

- MEV– Microscopia eletrônica de varredura
- MRSA– *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina
- NOR– Norfloxacino
- NTP– Número de pratos teóricos
- OMS– Organização Mundial da Saúde
- PDI– Índice de polidispersão
- PZ– Potencial zeta
- Resazurina– 7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido
- *S aureus*– *Staphylococcus aureus*
- TMP–Tamanho das partículas
- UV-vis – Ultravioleta-visível
- vs – Versus
- 6CN-Etil – 2-amino-6-etil-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofeno-3-carbonitrila

LISTA DE SÍMBOLOS

- cm^{-1} – Centímetros recíprocos
- kDa– Kilodalton
- λ – Comprimento de onda
- mg– Miligrama
- min– Minutos
- mL– Mililitro
- mV– Milivolt
- mL– Mililitro
- μg – Micrograma
- μL – Microlitro
- nm– Nanômetro
- %– Porcentagem
- $\pm$ – Mais ou menos
- F Estatística F (utilizada em ANOVA e testes de significância)
- R^2 – Coeficiente de determinação
- R_t – Tempo de retenção
- Rpm– Rotações por minuto
- Θ – Theta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	23
2.1 Infecções bacterianas	23
2.2 Resistência Bacteriana.....	24
2.2.1 ESKAPE.....	24
2.2.2 Mecanismos de resistência.....	26
2.3 Bombas de efluxo	27
2.3.1 NorA	29
2.3.2 MepA	30
2.3.3 Inibidores de bombas de efluxo	30
2.4 Fluoroquinolonas	31
2.5 Derivados tiofênicos.....	33
2.6 Nanopartículas lipídicas	34
2.6.1 Nanopartículas lipídicas sólidas.....	35
2.6.2 Carreadores lipídicos nanoestruturados	36
3. OBJETIVOS	45
3.1 Objetivo Geral.....	45
3.2 Objetivos Específicos	45
4. METODOLOGIA	46
4.1 Materiais	46
4.2 Obtenção do derivado 2-aminotiofênico 6CN-Etil (2-amino-6-etil-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-carbonitrila)	46
4.3 Determinação de condições para o desenvolvimento dos Carreadores Lipídicos Nanoestruturados.....	46
4.3.1 Triagem de lipídios líquidos	46
4.3.2 Triagem de lipídios sólidos	47
4.3.3 Triagem de Estabilizantes	47
4.3.4 Triagem da relação lipídica sólido-líquido.....	48
4.3.5 Triagem da amplitude e tempo de sonicação.....	48
4.3.6 Triagem da concentração de surfactante zwitteriônico	49
4.5 Obtenção dos carreadores lipídicos nanoestruturados contendo 6CN-Etil e norfloxacino	50
4.6 Liofilização dos carreadores lipídicos nanoestruturados	50

4.7	Caracterização físico-química dos carreadores lipídicos nanoestruturados	51
4.7.1	Determinação do tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta	51
4.7.2	Análise da eficiência de encapsulação (EE).....	51
4.7.3	Difração de Raios X (DRX)	52
4.7.4	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	52
4.7	Estudo de estabilidade ao longo de 90 dias.....	52
4.8	Validação do método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	53
4.9.1	Condições cromatograma	53
4.9.2	Adequação do sistema	53
4.9.4	Preparação da fase móvel	53
4.9.5	Linearidade	54
4.9.6	Precisão.....	54
4.9.7	Seletividade	54
4.9.8	Exatidão.....	55
4.9.9	Robustez	55
4.9.10	Limites inferiores de detecção (LID) e de quantificação (LIQ).....	55
4.10	Avaliação da atividade moduladora de antibióticos em cepas portadores de bombas de efluxo.....	56
4.10.1	Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM)	56
4.11	Análise Estatística	57
5.	RESULTADOS.....	58
5.1	Determinação de condições para o desenvolvimento dos Carreadores Lipídicos Nanoestruturados.....	58
5.1.1	Triagem lipídios líquidos	58
5.1.2	Triagem lipídios sólidos	59
5.1.3	Triagem de Estabilizantes	60
5.1.4	Triagem da relação lipídica sólido-líquido.....	61
5.1.5	Triagem da amplitude e tempo de sonicação.....	62
5.1.6	Triagem da concentração de surfactante zwitteriônico	64
5.2	Obtenção dos carreadores lipídicos nanoestruturados contendo 6CN-Etil e Norfloxacin	65
5.3	Liofilização dos carreadores lipídicos nanoestruturados.....	66
5.4	Caracterização físico-química dos carreadores lipídicos nanoestruturados.	68
5.4.1	Análise da eficiência de encapsulação (EE%)	68

5.4.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	69
5.4.3 Difração de raios X (DRX)	73
5.5 Estudo de estabilidade dos carreadores lipídicos nanoestruturados	76
5.6 Validação do método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	79
5.6.1 Desenvolvimento e otimização do método analítico	79
5.6.2 Seletividade	79
5.6.3 Linearidade	82
5.6.4 Limite de detecção e quantificação	87
5.6.5 Precisão	87
5.6.6 Exatidão.....	89
5.6.7 Robustez	90
5.7 Avaliação da atividade de modulação do carregador lipídico nanoestruturado frente as cepas <i>S. aureus</i> 1199B e K2068.....	91
5.7.1 Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM)	91
6. CONCLUSÃO	97
REFERÊNCIAS	98

1. INTRODUÇÃO

O uso indiscriminado de antibióticos, e a prevenção deficiente de infecções bacterianas têm contribuído para o aumento da pressão seletiva exercida sobre as bactérias favorecendo o surgimento de cepas de bactérias multirresistentes, cenário esse que é um dos grandes desafios atuais na saúde pública mundial. As bactérias que possuem maior destaque como causa dessas infecções são *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* (Chandal *et al.*, 2023; Tintino, 2021).

S. aureus é uma bactéria Gram-positiva, são patógenos oportunistas que causam infecções fatais quando presentes na corrente sanguínea. Estima-se que, em países desenvolvidos, ocorram, em média, de 80 a 190 casos de infecções na corrente sanguínea causadas por esse patógeno a cada 100.000 habitantes por ano. No ambiente hospitalar, infecções por *S. aureus* são comuns e extremamente graves, além disso, possui grande importância médica pela sua capacidade de adquirir resistência a múltiplos antibióticos como por exemplo as cepas resistentes a meticilina (MRSA) que são a causa de um aumento de três vezes na taxa de mortalidade comparado a cepas sensíveis, sendo um dos fatores que enquadram esse patógeno no grupo ESKAPE que é representado pelas bactérias *Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa* e espécies do gênero *Enterobacter*, são bactérias resistentes a antibióticos e causa das infecções nosocomiais extremamente graves (Cheung *et al.*, 2021; Tintino, 2021).

Dentre os principais mecanismos de resistência a antimicrobianos desenvolvidos pelas bactérias são a superexpressão de proteínas transmembranares conhecidas como bombas de efluxo. Essas proteínas são sistemas de transporte ativo, que tem como função extrudar substâncias do citoplasma, para o meio extracelular das bactérias. Dentre essas substâncias, incluem-se várias classes de antibióticos (Chandal *et al.*, 2023).

Staphylococcus aureus apresentam seis principais famílias de bomba de efluxo, dentre essas a superfamília facilitadora principal, que inclui a bomba NorA, e a família de extrusão de multidrogas e tóxicos que expressam a bomba MepA, conferem um mecanismo de resistência mais eficiente e ampla resistência a antibióticos, incluindo as fluoroquinolonas (Compagne *et al.*, 2023; Huang *et al.*, 2023).

Os derivados tiofênicos são um grupo de compostos heterocíclicos que tem atraído a atenção da comunidade científica, por possuírem diversas atividades farmacológicas como antiprotozoária, antifúngica, antiproliferativa e a capacidade de atuar como adjuvantes de antibióticos através da inibição de bombas de efluxo, porém que apresentam baixa solubilidade em água, sendo um fator limitante para a sua biodisponibilidade. Os inibidores de bomba de efluxo são moléculas que interferem no funcionamento das bombas de efluxo, impedindo a extrusão de substâncias entendidas como nocivas à bactéria, a exemplo dos antibióticos (Duvauchelle *et al.*, 2022; Huang *et al.*, 2023).

Toda via, o uso de sistemas de entrega de fármacos como a encapsulação em nanopartículas lipídicas surge como uma alternativa para melhorar a solubilidade aparente de ativos, pois além de possuírem baixa toxicidade, são biodegradáveis e biocompatíveis (Fahmy *et al.*, 2020). Esses sistemas lipídicos podem ser classificados em nanopartículas lipídicas sólidas que são a primeira geração formadas somente por uma matriz sólida (lipídio sólido) e na segunda geração os carreadores lipídicos nanoestruturados que são formados por uma mistura de um lipídio sólido e um líquido que confere vantagens sobre a primeira geração, por possuírem maior capacidade de carregamento de fármacos, na entrega e na estabilidade (Akbari *et al.*, 2022).

No presente estudo, e no intuito de contribuir cientificamente com a problemática relacionada a resistência antimicrobiana, desenvolver e caracterizar carreadores lipídicos nanoestruturados contendo o derivado tiofênico 2-amino-6-etil-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-carbonitrila (6CN-Etil), o qual apresenta potencial de inibição de bombas de efluxo bacteriana, associado ao antibiótico fluoroquinolônico norfloxacino, afim de avaliar a atividade antimicrobiana do sistema frente as cepas de *S. aureus* que superexpressam as bombas de efluxo NorA e MepA com objetivo de modular a resistência dessas cepas de *S. aureus* ao antibiótico.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Infecções bacterianas

A trajetória do desenvolvimento humano ao longo da história sempre foi marcada pelo esforço contínuo contra diversas doenças, dentre estas as infecções bacterianas, sendo um dos maiores problemas públicos mundiais atualmente. Um estudo publicado na *The Lancet* em 2019 relatou que, de 13,7 milhões de mortes relacionadas a infecções, 7,7 milhões foram associadas a patógenos bacterianos, representando 13,6% de todas as mortes globais, além disso, estipula-se que se não for implementado ações para resolver essa questão, até o ano de 2050 a taxa de mortalidade será de 10 milhões de mortes ao ano (Aflakian *et al.*, 2023; Hu *et al.*, 2020; Samreen *et al.*, 2021).

As bactérias são organismos fundamentais da microbiota humana, colonizando diversos tecidos, como a pele e o trato gastrointestinal, no entanto, infecções bacterianas ocorrem quando há uma ruptura no equilíbrio natural entre as bactérias e as células hospedeiras. Esse desequilíbrio pode surgir quando bactérias migram de áreas onde normalmente vivem, como o nariz, boca, uretra e intestinos, para locais onde sua presença é atípica, como os pulmões, pâncreas, sangue, cérebro e rins. Essas infecções são caracterizadas pela invasão e multiplicação de bactérias patogênicas no organismo, resultando em danos aos tecidos, disfunção celular e até morte, frequentemente causados pela liberação de toxinas ou outros metabólitos prejudiciais produzidos pelas bactérias (Deusenbery *et al.*, 2021; Hu *et al.*, 2020).

A infecções bacterianas podem ser transmitidas por vários meios, inclusive até mesmo em ambientes hospitalares, no entanto como exemplo, a colonização de *Enterococcus faecium*, ocorre frequentemente devido ao uso de dispositivos médicos, como cateteres, dispositivos cardíacos e seringas contaminadas (Rajaei *et al.*, 2024). Além disso, infecções por *Staphylococcus aureus* e *Acinetobacter baumannii* podem ser transmitidas através do contato com pessoas ou superfícies contaminadas, além da ingestão de alimentos ou água contaminada (Gweryina *et al.*, 2024; Way *et al.*, 2024). A transmissão por *Streptococcus pneumoniae*, ocorre principalmente pela inalação de gotículas infectadas, já doenças como a doença de Lyme são transmitidas por vetores

como por picadas de insetos, especificamente pelo carrapato do gênero *Ixodes*, que pode ser um vetor da bactéria *Borrelia burgdorferi* (Haslund *et al.*, 2024; Parker *et al.*, 2024).

2.2 Resistência Bacteriana

A resistência antimicrobiana é a capacidade de microrganismos desenvolverem habilidades para sobreviver a substâncias que em situações normais seriam letais ou inibiriam seu crescimento, esse mecanismo é um processo natural de evolução que geralmente ocorre por mutação ou aquisição de novos genes de mecanismos de resistência, no entanto também foi intensificada pelo uso indevido de antibióticos, a automedicação, uso em infecções não bacterianas (como viroses), aplicação de antibióticos em animais, além do descarte incorreto através de diversas rotas de transferência como a água, alimentos e adubo corroborando para um dos problemas mais graves da saúde mundial (Li *et al.*, 2023; Monteiro *et al.*, 2020; Samreen *et al.*, 2021).

As bactérias podem apresentar dois tipos de mecanismos de resistência: o intrínseco e o adquirido. A resistência intrínseca possui características funcionais ou estruturais já presentes nas bactérias codificados por cromossomos como as enzimas inativadoras, bombas de efluxo e barreira de permeabilidade, já os mecanismos adquiridos são aqueles que são alcançados a partir das transferências horizontais dos genes, ou seja, alterações no genoma bacteriano, esse mecanismo é o mais grave e que confere um rápido avanço na resistência bacteriana e pode ser transferida entre os genes rapidamente entre os microrganismos (Baran *et al.*, 2023).

2.2.1 ESKAPE

No ano de 2017 a organização mundial da saúde (OMS) desenvolveu uma lista de prioridades referente a resistência a antibióticos para auxiliar na pesquisa e desenvolvimento de tratamentos eficazes e foram classificados no grupo de prioridade 1 os patógenos ESKAPE multirresistentes Gram-negativos, incluindo *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp*, já no grupo de prioridade 2, encontram-se os patógenos ESKAPE Gram-positivos *Enterococcus faecium* e *Staphylococcus aureus*. Os patógenos ESKAPE são conhecidos por causarem infecções associadas a altas taxas de mortalidade e morbidade em todo o mundo (Denissen *et al.*, 2022).

Os principais mecanismos pelos quais os patógenos do grupo ESKAPE desenvolvem resistência incluem a prevenção da absorção do fármaco, a alteração dos alvos moleculares, a inativação dos antibióticos e a expulsão dos mesmos através de bombas de efluxo (Denissen *et al.*, 2022). No caso de *Acinetobacter baumannii*, sua plasticidade genética permite mutações rápidas, tornando-o um dos patógenos ESKAPE mais desafiadores para o tratamento, especialmente em ambientes hospitalares. Além disso, a presença desses patógenos já foi relatada na microbiota intestinal de pacientes submetidos a altas doses de antibióticos em estado crítico, como nos casos de *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*, que são os principais responsáveis por infecções associadas à saúde (Babouee *et al.*, 2024).

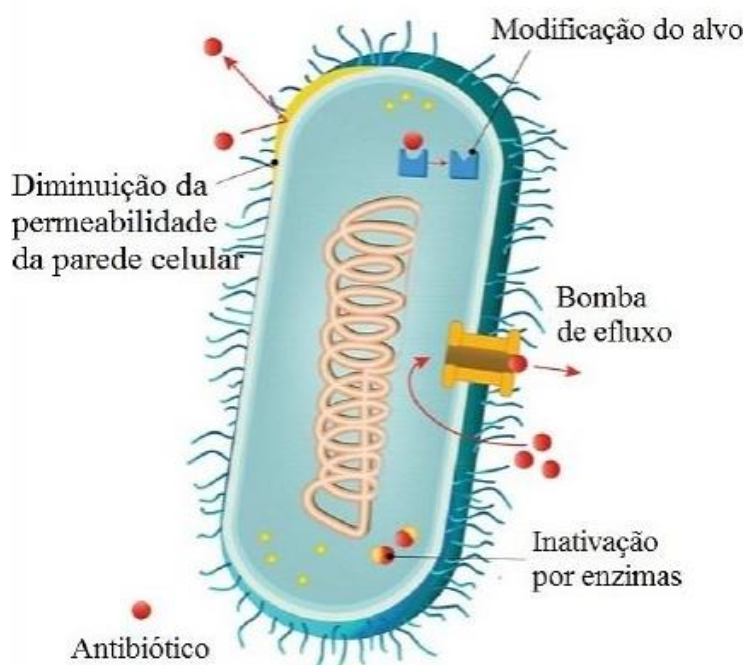
Staphylococcus aureus é amplamente conhecida como a “superbactéria” mais preocupante entre as Gram-positivas, devido à sua capacidade de desenvolver resistência a antibióticos, desde a década de 1940 as cepas resistentes à penicilina surgiram nos hospitais poucos anos após a introdução desse fármaco na clínica e rapidamente se disseminaram pela população, atingindo proporções pandêmicas (Dashtbani; Brown, 2021). A resistência à penicilina ocorreu pela incorporação do gene *blaZ*, que codifica a β -lactamase, enzima que quebra o anel β -lactâmico da penicilina e neutraliza sua ação antimicrobiana. O termo “superbactéria” chamou a atenção de pesquisadores e autoridades de saúde pública, devido ao impacto em relação a morbidade e mortalidade causado pelas infecções por *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina fora do ambiente hospitalar, além dos antibióticos β -lactâmicos, o *S. aureus* desenvolveu resistência a diversos outros antibióticos, como vancomicina, eritromicina, gentamicina e oxacilina, reduzindo significativamente as opções disponíveis para o tratamento dessas infecções (Baran *et al.*, 2023; Dashtbani; Brown, 2021).

O uso de antibióticos é o fator chave para a aceleração do desenvolvimento dessas infecções com bactérias multirresistentes, gerando uma vantagem seletiva das populações bacterianas resistentes, quando competem com bactérias comensais suscetíveis, podendo levar a uma alteração no ecossistema de simbiose entre os microrganismos e o hospedeiro durante o tratamento com antibióticos, gerando um reservatório de bactérias resistentes, que pode persistir mesmo após a descontinuação de antimicrobianos (Babouee *et al.*, 2024).

2.2.2 Mecanismos de resistência

Os mecanismos de resistência intrínsecos e mecanismos de resistência adquiridos, podem ser observados as mesmas alterações ou adaptações nos micro-organismos, que são: redução da permeabilidade do envelope bacteriano, aumento da expressão e a atividade de bombas de efluxo, síntese de enzimas, formação de biofilmes e modificações, substituições ou rompimentos de alvos bacterianos de antibióticos, entre outras (Figura 1) (Almatar *et al.*, 2020; Monteiro *et al.*, 2020).

Figura 1: Principais mecanismos de resistência antimicrobianos



Fonte: Adaptado de Tintino (2021)

Os mecanismos de resistência devido a alterações na estrutura do alvo do antibiótico podem ocorrer por mutações genéticas, que modificam o alvo e impedem a ligação do antimicrobiano, comprometendo sua ação, um exemplo clássico é o de *Streptococcus pneumoniae*, que desenvolve resistência à penicilina através de um mosaico gênico que codifica uma proteína de ligação à penicilina, de forma semelhante, *Staphylococcus aureus* adquire resistência à metilicina (Abushaheen *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2023).

Por outro lado, a modificação e proteção do alvo não dependem de mutações genéticas, mas de mudanças pós-transcricionais que envolvem a ação de enzimas. Isso

pode reduzir a afinidade do antibiótico pelo seu alvo ou inativá-lo por meio de hidrólise, como ocorre com enzimas β -lactamases (Abushaheen *et al.*, 2020). Além disso, a resistência pode resultar da transferência de grupos químicos para o antibiótico. Outros mecanismos incluem a prevenção do acesso ao alvo, seja pela redução da permeabilidade da membrana ou pela ação de bombas de efluxo que extrudem substâncias nocivas do interior da célula (Almatar *et al.*, 2020).

2.3 Bombas de efluxo

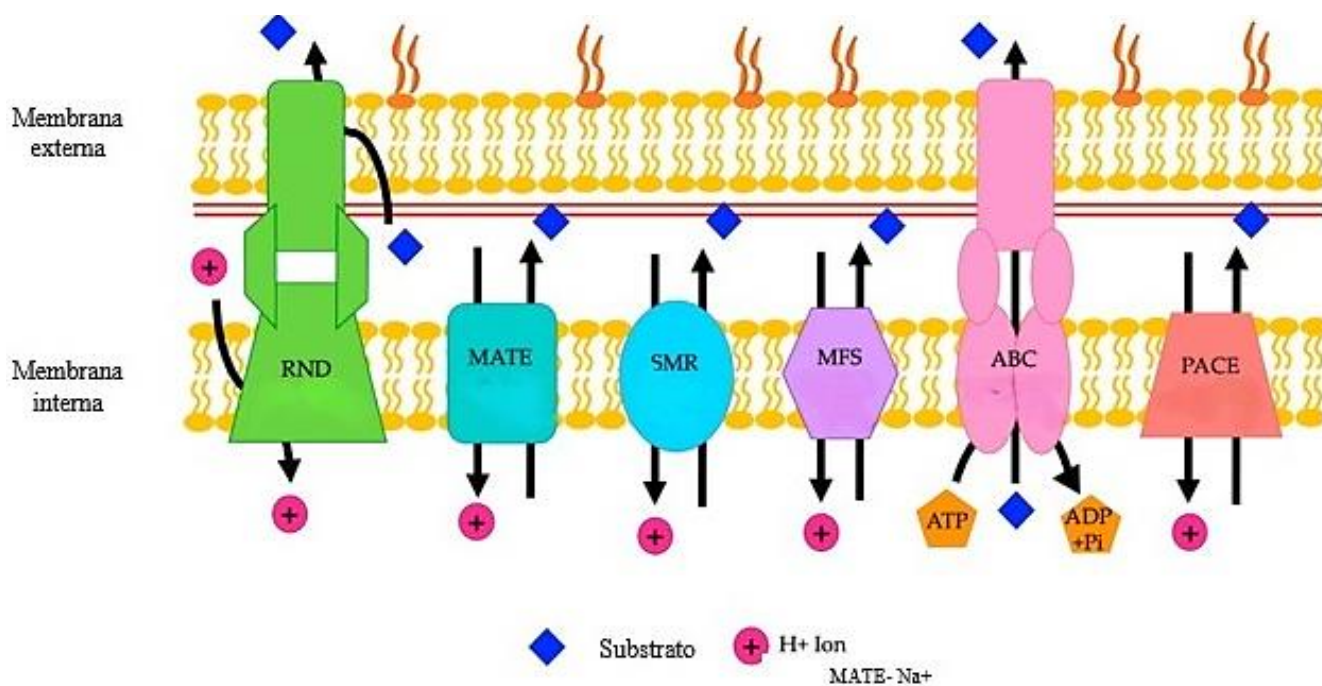
As bombas de efluxo foram descobertas em 1976 quando Juliano e Ling identificaram a glicoproteína P em células de roedores, que apresentavam resistência a medicamentos anticâncer, as bombas de efluxo são proteínas transportadoras presentes nas membranas de bactérias, que reconhecem e bombeiam ativamente vários substratos incluindo antibióticos. São encontradas em bactérias gram-positivas e gram-negativas e são produzidas para contribuir na resistência microbiana, são classificadas em seis principais famílias: Família de Nodulação-Divisão de Resistência, Superfamília Facilitadora Principal, família de transportadores ABC, Família de Extrusão de Compostos Tóxicos e Multidrogas, pequena família multidrogas e Superfamília de Compostos Antimicrobianos Proteobacterianos (Figura 2) (Huang *et al.*, 2022; Kumawat *et al.*, 2023).

- A família de transportadores ABC é composta por bombas de efluxo que são classificadas como transportadores ativos primários, esses transportadores dependem da energia gerada pela hidrólise de ATP para translocar diversos substratos através da membrana celular. Além disso, eles também podem utilizar a energia do gradiente de prótons ou de sódio para realizar o transporte de substâncias (Kumawat *et al.*, 2023; Huang *et al.*, 2022).
- A família de Extrusão de Compostos Tóxicos e Multidrogas (MATE) utilizam gradientes de H^+ e Na^+ para expulsar drogas poliaromáticas e catiônicas. Um exemplo é o NorM, um antiportador de Na^+ de *Vibrio parahaemolyticus*, que confere resistência a corantes, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos (Kumawat *et al.*, 2023; Maldonado *et al.*, 2023).
- A superfamília facilitadora principal (MFS) é um grupo de proteínas de membrana que realiza o transporte de pequenos solutos pelas células em resposta a gradientes quimiosmóticos, essa família transporta diversos substratos, como açúcares, drogas, aminoácidos e metabólitos, ela é uma das maiores famílias de

transportadores secundários ativos, composta por três tipos principais: simportadores, que transportam substratos e íons na mesma direção, antiportadores, que movem substratos e íons em direções opostas e uniportadores, que transportam solutos sem envolver íons (Kumawat *et al.*, 2023; Pasqua *et al.*, 2019).

- A Família de Nodulação-Divisão de Resistência (RND) desempenha um papel essencial na biologia de muitos patógenos, sendo crucial para sua patogenicidade, essas bombas ajudam a exportar substâncias do hospedeiro, como sais biliares, ácidos graxos e hormônios esteroides, o que permite às bactérias sobreviverem dentro do organismo, localizam-se na membrana interna e são impulsionadas pela força motriz dos prótons, funcionando como transportadores primários (Kumawat *et al.*, 2023; Zack *et al.*, 2024).
- A Superfamília de Compostos Antimicrobianos Proteobacterianos (PACE) é formada por transportadores que são amplamente conservados nos genomas de várias espécies bacterianas, aproximadamente 623 linhagens possuem todos os genes responsáveis pela codificação dessas proteínas, esses transportadores utilizam a energia proveniente de gradientes de prótons (H^+) ou sódio (Na^+) para facilitar o movimento de substâncias (Huang *et al.*, 2022; Kumawat *et al.*, 2023).
- A Pequena Família Multidrogas (SMR) é semelhante à Superfamília Facilitadora Principal, sua fonte de energia provém da força motriz dos prótons. Utilizam o gradiente de H^+ através da membrana como energia para expulsar substâncias da célula, estão presentes tanto em bactérias Gram-positivas quanto em Gram-negativas (Kumawat *et al.*, 2023; Zack *et al.*, 2024).

A superexpressão dessas bombas multirresistentes têm sido associada à resistência a medicamentos e associada a distúrbios clínicos, por isso o mecanismo de efluxo bacteriano é considerado uma ameaça séria, já que isso aumenta a concentração de antibióticos, diminui a suscetibilidade de cepas clínicas e limita o surgimento de novas resistências (Kumawat *et al.*, 2023).

Figura 2: Principais famílias de bombas de efluxo

Fonte: Adaptado de Zack et al.,2024

2.3.1 NorA

As bombas de efluxo NorA são codificadas pelo gene *norA*, foram identificadas pela primeira vez em um hospital no Japão em 1986 e descritas anteriormente em um isolado resistente à fluoroquinolona, são proteínas que exportam vários antimicrobianos estruturalmente não relacionados (MDR) e são pertencentes a superfamília facilitadora principal, utilizam a força motriz de prótons para mediar o efluxo de drogas, sendo o sistema de efluxo mais estudado em *S. aureus* e presente em todas as cepas resistentes a meticilina, podendo extrudar diversos substratos estruturalmente diversos, incluindo quinolonas, fluoroquinolonas, pentamidina, berberina, brometo de etídio e acridina, proporcionando resistência ampla a uma gama de antibióticos (Kumar; Tudu, 2023; Tintino, 2021).

Essas proteínas estão localizadas na membrana citoplasmática, possuem um peso molecular de 42,3 kDa e são compostas por 388 aminoácidos, estruturalmente, apresentam 12 segmentos transmembranares e são organizadas em duas metades simétricas, o que facilita a expulsão de substratos como as fluorquinolonas, a medida que prótons são transportados para dentro da célula, esse processo ocorre através de um

mecanismo de alternância, conhecido como “interruptor basculante”, as bombas de efluxo NorA são codificadas pelo gene *norA* de 1164 pb e apresenta variabilidade genética com três principais alelos *norAI*, *norAII* e *norAIII*, que possuem diferenças em suas sequências nucleotídicas conferindo na resistência dessas proteínas a diversos antibióticos (Brawley *et al.*, 2022; Martin *et al.*, 2024).

2.3.2 MepA

Em estudos realizados com genes mutantes rompidos de *S. aureus*, a bomba de efluxo MepA foi identificada, sendo o primeiro transportador da família de extrusão de multidroga e tóxicos em *S. aureus* possuindo o fenótipo de resistência na cepa SA-K2068, em sua estrutura apresentam 451 aminoácidos e 12 segmentos transmembranares, essas proteínas utilizam o gradiente eletroquímico de hidrogênio e sódio para extrudar diversas drogas através das membranas celulares adquirindo um formato de “V” abrindo-se para fora da célula, as bombas de efluxo MepA são codificadas por genes localizados no DNA bacteriano central de *S. aureus* o que conferem a resistência a fluoquinolonas (Da Costa *et al.*, 2021; Freitas *et al.*, 2021).

As bombas de efluxo MepA tem como substratos as fluoroquinolonas hidrofílicas que são ciprofloxacina, norfloxacina e moxifloxacina, sparfloxacina e glicilciclinas que são fluoroquinolonas hidrofóbicas, além de compostos de amônio quaternário como cloreto de benzalcônio, dequalinium, tetrafenilfosfônio, cetrimida, pentamidina e como brometo de etídio (Huang *et al.*, 2023).

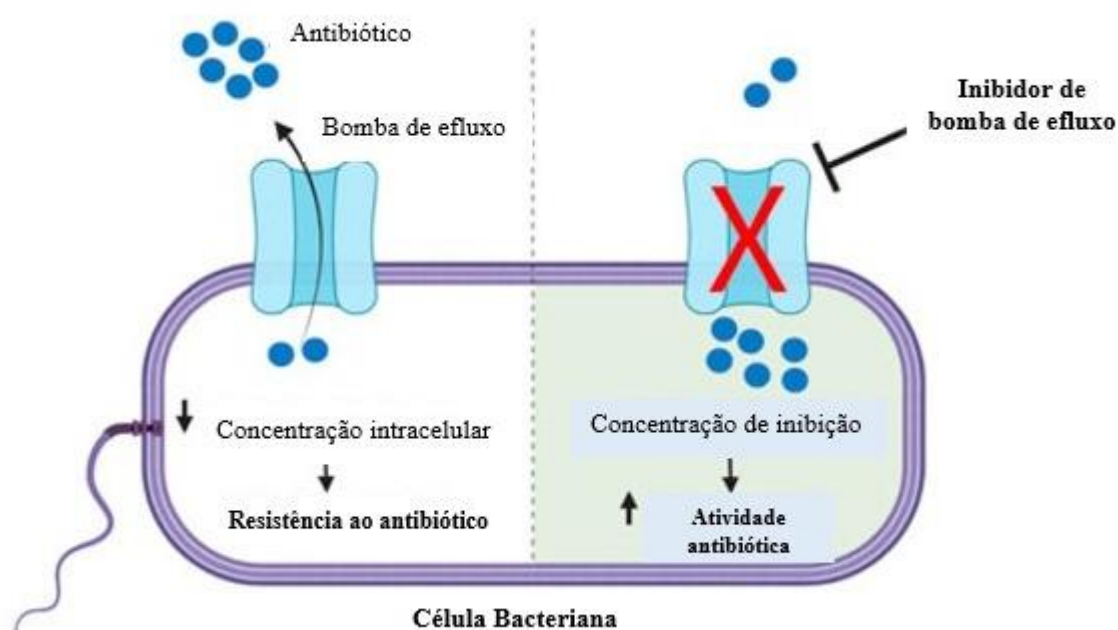
2.3.3 Inibidores de bombas de efluxo

Os inibidores da bomba de efluxo têm sido um grande alvo de pesquisas para a investigação de novos agentes farmacêutico, esses compostos são capazes de inibir as bombas de efluxo, interrompendo a sua função. Esses inibidores podem ser classificados em dois tipos principais: inibidores competitivos, que competem diretamente com o substrato pelo local de ligação na bomba, e inibidores não competitivos, que interferem de outras maneiras no mecanismo de efluxo, sem competir diretamente pelo sítio de ligação do substrato (Almatar *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2023).

Os inibidores de bombas de efluxo ideais não devem possuir atividade antimicrobiana, mas quando em combinação devem contribuir para potencializar ou reestabelecer (podendo restaurar a sensibilidade bacteriana) a ação de antibióticos, prolongando a ação e eficácia dos antibióticos, reduzindo a taxa de resistência.

Geralmente para avaliar a atividade da bomba de efluxo por exemplo NorA, utiliza-se o corante brometo de etídio (EtBr), um intercalador de DNA que emite fluorescência sob luz UV, o acúmulo intracelular de EtBr em ensaios permite estimar a potência dos inibidores da NorA, já que uma maior inibição da bomba resulta em maior acúmulo do corante na célula, outro método de detecção da atividade de inibidores de bomba de efluxo é por meio da sua capacidade de alterar a concentração inibitória mínima de antibióticos (Figura 3) (Kumar; Tudu, 2023; Verma *et al.*, 2021).

Figura 3: Mecanismo de inibição de bomba de efluxo



Fonte: Adaptado de Dias *et al.*, 2022

2.4 Fluoroquinolonas

A descoberta dos antibióticos foi uma das maiores revoluções da medicina, transformando o tratamento de infecções bacterianas e reduzindo substancialmente as taxas de mortalidade e doenças relacionadas. Entre os anos de 1930 e 1960, diversos antibióticos foram descobertos, sendo esse período conhecido como a "Era de Ouro dos Antibióticos", mas à medida que novos antibióticos eram descobertos surgiam as primeiras cepas de bactérias resistentes. O termo “antibiótico” surgiu a partir de 1942 por Selman Waksman e definindo como substância produzida a partir de microrganismo capaz de inibir o crescimento ou matar outros microrganismos, mas atualmente essa

definição foi mais amplificada, tendo em vista que existe várias origens de antibióticos e mecanismos de ação como: Inibição da biossíntese da parede celular bacteriana, ruptura da integridade da membrana celular, inibição de ácidos nucleicos e síntese de proteínas e alterações de processos metabólicos (Abushaheen *et al.*, 2020; Baran *et al.*, 2023).

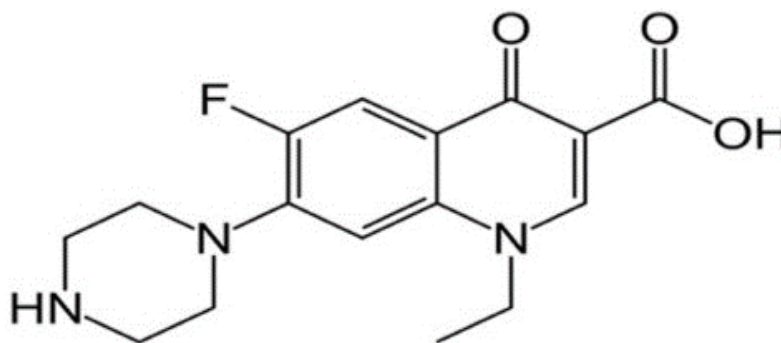
As fluoroquinolonas são antimicrobianos derivados de ácido nalidíxico sintetizados por George Lesher na década de 1960, dentre os antibióticos são bastantes incomuns por não terem origem de organismos vivos mas serem sintetizadas quimicamente, possuem atividade contra microrganismos gram-positivos e gram-negativos e geralmente é administrado por via oral, possui uma boa absorção e atinge concentrações terapêuticas e são metabolizadas no fígado parcialmente; sua via de eliminação é por via renal, cerca de 30% a 60% é eliminada pela urina. Para uso humano as fluoroquinolonas são classificadas em 1^a, 2^a, 3^a e 4^a gerações (Tabela 1) (Rusu *et al.*, 2023).

Tabela 1: Classificação das fluoroquinolonas

Fluoroquinolonas			
1 ^a Geração	2 ^o Geração	3 ^o Geração	4 ^o Geração
Cinoxacina	Ciprofloxacino	Balofloxacino	Clinafloxacino
Flumequina	Norfloxacino	Gatifloxacino	Garenoxacino
Ácido Nalidíxico	Fleroxacino	Grepafloxacino	Gemifloxacino
Ácido Pipemídico	Lomefloxacino	Levofloxacino	Moxifloxacino
Rosoxacina	Ofloxacino	Pazufloxacino	Sitafloxacino
Acrosoxacino	Enoxacino	Esparfloxacino	Trovafloxacino
Droxacino	Pefloxacino	Tosufloxacino	Alatrofloxacino

Fonte: Rusu *et al.*, 2023; Brar *et al.*, 2020

O norfloxacino (Figura 4) é um fluoroquinolona de amplo espectro (gram-positivas e negativas), utilizado para o tratamento de infecções do trato urinário, gastrointestinal, infecções na pele, vias aéreas superiores e inferiores e infecções sexualmente transmissíveis, atua inibindo a síntese do ácido desoxirribonucleico bacteriano e também possui propriedade bactericida, no entanto estudos mostraram que o uso do norfloxacino pode estar relacionado como potencial associação com a multirresistência a medicamentos, além apresentar problemas relacionados a sua biodisponibilidade, solubilidade aquosa e a terapia com altas doses a longo prazo podem gerar vários efeitos colaterais (Bhatt; Chatterjee, 2022; Yakupova *et al.*, 2022).

Figura 4: Estrutura química do norfloxacin

Fonte: Adaptado de Khan *et al.*, 2021

A síntese de DNA bacteriano depende de enzimas chamadas topoisomerasas, que são divididas em tipo IA (Topo I e Topo III) e tipo IIA (DNA girase e Topo IV) na ausência delas o superenrolamento do DNA é afetado, antibióticos de amplo espectro como as fluoroquinolonas atuam inibindo a DNA girase em bactérias gram-negativas e a topoisomerase IV em gram-positivas, bloqueando a replicação do DNA, essa inibição altera o superenrolamento, causando a quebra do DNA e resultando na morte celular, independentemente da síntese de proteínas (Abushaheen *et al.*, 2020; Brar *et al.*, 2020).

Os principais mecanismos de resistência bacteriana as fluoroquinolonas são as mutações na DNA girase, o aumento da expressão de bombas de efluxo, e alterações na permeabilidade da membrana externa de bactérias gram-negativas (Abushaheen *et al.*, 2020; Rusu *et al.*, 2023).

2.5 Derivados tiofênicos

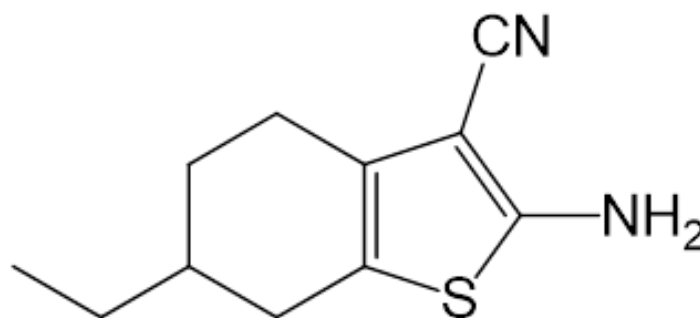
Os anéis heterocíclicos são estruturas bastante estudadas ao longo dos anos na química medicinal e na descoberta de novos medicamentos, graças as suas propriedades e representando cerca de 85% de todos os compostos biologicamente ativos, os derivados 2-amino-tiofenos em especial apresentam núcleos heteroaromáticos formados por cinco membros e sintetizados classicamente pelo métodos de Gewald, foram descritos primeiramente por Campaigne e Foye na década de 1950 e popularizada posteriormente por Gewald na década seguinte, a reação consiste numa reação multicomponentes envolvendo um composto contendo uma carbonila (aldeídos ou cetonas), com um composto metilênico ativo, contendo uma nitrila, na presença de uma fonte de enxofre

que leva a formação de um anel tiofênico contendo um grupo amino na posição 2, e um grupo retirador de elétrons na posição 3 (Duvauchelle *et al.*, 2022).

Os derivados 2-amino tiofênicos possuem diversas atividades biológicas descritas na literatura, incluindo: antiprotozoária, antifúngica, antiproliferativa, além da atividade antibacteriana devido a capacidade desses derivados de se comportar como inibidor de bomba de efluxo, melhorando a atividade de fármacos antibacterianos como a ciprofloxacina em cepas que expressam a bomba de efluxo NorA (Duvauchelle *et al.*, 2023).

Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa mostraram que os derivados 2-amino-tiofênicos diminuíram em 16 vezes a concentração mínima inibitória da ciprofloxacina (de forma equivalente a reserpina (conhecido inibidor de proteínas de efluxo NorA)) contra cepas de *Staphylococcus aureus* sendo resultados promissores para o efeito de sinergia com o antibiótico, (Da Cruz *et al.*, 2020). Em resultados ainda não publicados pelo nosso grupo de pesquisa em um estudo que investigou a atividade inibitória sob bombas de efluxo NorA e MepA, de um grupo de 13 derivados 2-amino tiofênicos, foi identificado que o derivado 2-aminotiofênico codificado por 6CN-Etil (Figura 5) ajudou a reestabelecer a susceptibilidade às fluoroquinolonas (norfloxacino e ciprofloxacino) em cepas de *Staphylococcus aureus* que superexpressam as bombas de efluxo NorA e MepA, e que apresentam resistência a esses antibióticos.

Figura 5: Estrutura química 6CN-Etil



Fonte: Autor, 2024

2.6 Nanopartículas lipídicas

Nos últimos anos o ramo da nanotecnologia vem crescendo no meio científico e fornecendo ferramentas essenciais para o desenvolvimento de novos sistemas de administração de fármacos atendendo as necessidades atuais, tendo em vista que sistemas

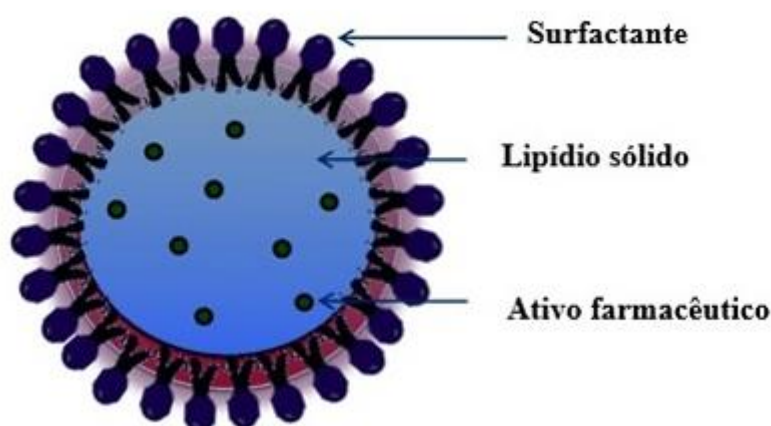
com entrega inteligente e melhor controle de liberação favorecem essa popularização, as nanopartículas lipídicas surgem como uma alternativa às nanopartículas poliméricas, lipossomas e emulsões, por possuírem benefícios como a ampla variedade de materiais para a seleção das formulações, a baixa toxicidade dos lipídios utilizados na produção das nanopartículas e por serem reconhecidos como seguros (Syed *et al.*, 2023).

As nanopartículas lipídicas são carreadores bastantes versáteis por poderem transportar moléculas hidrofóbicas, hidrofílicas, de pequeno tamanho, proteínas e ácidos nucleicos, sendo os lipossomas a primeira geração de nanopartículas lipídicas seguidos pelas nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados. As novas gerações apresentam estruturas internas mais sofisticadas e maior estabilidade física, esses sistemas tem a capacidade de controlar a liberação e a localização de fármacos no organismo, sendo promissores para o tratamento de diversas doenças (Tenchov *et al.*, 2021).

2.6.1 Nanopartículas lipídicas sólidas

As nanopartículas lipídicas sólidas são derivadas das nanoemulsões de óleo e água, no entanto com um lipídio sólido, essa primeira geração possui vantagens como o uso de lipídios fisiológicos, evita o uso de solventes orgânicos, apresenta a viabilidade da produção em larga escala, além de melhorar a biodisponibilidade, e pode dar proteção a medicamentos sensíveis (Salvi *et al.*, 2019).

Esses sistemas de liberação de fármacos geralmente possuem formato esférico, com tamanho variando entre 50 e 1000 nm, são compostos com uma matriz de núcleo sólido, os principais componentes dessas formulações incluem lipídios, que permanecem em estado sólido à temperatura ambiente, emulsificantes ou uma combinação de ambos, além de ingredientes farmacêuticos ativos e um sistema de solvente apropriado (Figura 6). Toda via a incorporação de fármacos em nanopartículas sólidas pode causar gelificação, transições polimórficas e baixa incorporação de fármacos devido a estrutura cristalina dos lipídios sólidos (Duan *et al.*, 2020).

Figura 6: Nanopartícula lipídica sólida

Fonte: Adaptado de Duan *et al.*, 2020

2.6.2 Carreadores lipídicos nanoestruturados

Estudos realizados demonstraram algumas limitações nos sistemas de nanopartículas lipídicas sólidas como menor capacidade de carga dos ativos devido a matriz altamente ordenada pelo lipídio sólido, baixa estabilidade a longo prazo e encapsulação limitada de certos ativos, por isso na virada do milênio foi desenvolvido por Muller uma nova geração de nanopartículas lipídicas, os carreadores lipídicos nanoestruturados, que surgiram para superar as desvantagens dos sistemas de primeira geração, são produzidos a partir da mistura de lipídios sólidos com uma incorporação de lipídios líquidos o que gera o rompimento da estrutura cristalina formando uma matriz com imperfeições o que permite a formação de espaços para acomodação de uma quantidade significativa de fármacos, dessa forma, possibilitando uma capacidade de carga e estabilidade superiores do fármaco em comparação as nanopartículas sólidas surgindo como uma excelente alternativa, além de apresentar vantagens como prevenir a expulsão do ativo precocemente durante o armazenamento, controle da liberação do ativo, fácil manipulação e mais acessível, além da estabilidade melhorada (Abla *et al.*, 2023; Tenchov *et al.*, 2021).

Os carreadores lipídicos nanoestruturados tem o potencial de melhorar a biodisponibilidade oral de fármacos pouco solúveis em água. Atualmente esses sistemas já são aplicados em produtos cosméticos como cremes dérmicos, sua aplicação é bastante estudada em diversos âmbitos, como no direcionamento de medicamentos para diversas doenças com foco em tecidos pulmonares, cerebrais, oculares e em tumores maligno,

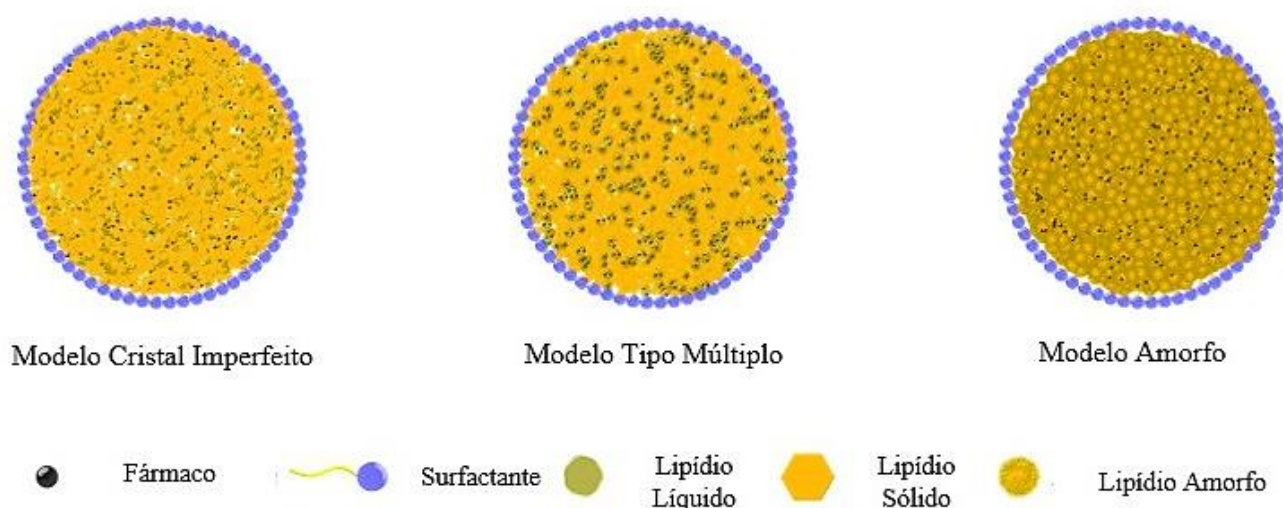
além de serem investigados para atuar na reversão de resistência a múltiplos medicamentos, na indústria alimentícia e na terapia genica (Khan *et al.*, 2023; Salvi *et al.*, 2019).

Somado a isso, os carreadores lipídicos nanoestruturados fornecem uma opção vantajosa para a administração de medicamentos por via oral, pois podem ser absorvidos por serem a base de lipídios por diversos mecanismos como transporte transcelular, transporte mediado por células M, por carreadores ou através da mucoadesão, os fármacos lipofílicos e nanocarreadores são absorvidos no intestino por endocitose, principalmente por células M, que os transportam pelo sistema linfático, as lipases quebram triglicerídeos, formando micelas com sais biliares que facilitam a absorção, a mucoadesão aumenta a absorção e o tempo de residência de nanocarreadores no trato gastrointestinal (Khan *et al.*, 2023; Salvi *et al.*, 2019).

De acordo com a localização do fármaco incorporado no carreador lipídico nanoestruturado esses sistemas podem ser classificados em três tipos (Figura 7): O modelo do cristal imperfeito, se trata de uma matriz desorganizada onde existem vários espaços vazios e espaços que podem acomodar uma maior quantidade de fármaco em aglomerados amorfos, isso ocorre a partir da mistura com quantidades adequadas de lipídio sólido com lipídio líquido, essa mistura garante um aumento na carga útil do fármaco. Já o modelo do tipo múltiplo é composto por água/lipídio sólido/lipídio líquido, geralmente alguns fármacos são mais solúveis a lipídios líquido, nesse tipo de carreador são utilizadas frações maiores de lipídios líquidos isso causa a separação de fases na matriz formando compartimentos nanométricos envolvidos pela matriz sólida, isso melhora a eficiência de encapsulação dos ativos e liberação controlada. Por último, o terceiro tipo, o modelo amorfo onde lipídios são misturados de forma a diminuir o

vazamento de fármacos durante a cristalização, sendo a matriz amorfa e homogênea (Chauhan *et al.*, 2020).

Figura 7: Tipos de carreadores lipídicos nanoestruturados



Fonte: Adaptado de Khan *et al.*, 2022

2.6.2.1 Métodos de obtenção dos carreadores lipídicos nanoestruturados

Existem diversos métodos de obtenção de carreadores lipídicos nanoestruturados dentre esses estão a técnica de homogeneização a quente de alta pressão, método de fusão a quente por sonicação, homogeneização a frio de alta pressão, homogeneização de alta velocidade/cisalhamento, microemulsão, técnica de difusão e evaporação de solventes, extrusão de fusão a quente, técnica de injeção de solvente e técnica de sonicação por fusão a quente (Figura 8) (Chauhan *et al.*, 2020; Khan *et al.*, 2022).

- Homogeneização a quente de alta pressão: É uma técnica escalonável, o processo de alta pressão reduz o tamanho das partículas, onde inicialmente os lipídios líquidos e sólidos são derretidos e é adicionada uma fase aquosa sob agitação, posteriormente essa microemulsão quente é submetida a um homogeneizador de alta pressão e resfriada para obter os carreadores lipídicos nanoestruturados, mas não é ideal para moléculas termossensíveis (Khan *et al.*, 2022; Taha *et al.*, 2020).
- Homogeneização a frio de alta pressão: Apresenta similaridade com a técnica de homogeneização a quente, no entanto nesse método a mistura lipídica e aquosa são mantidas em temperatura na faixa de 2°- 6° C sob agitação, posteriormente

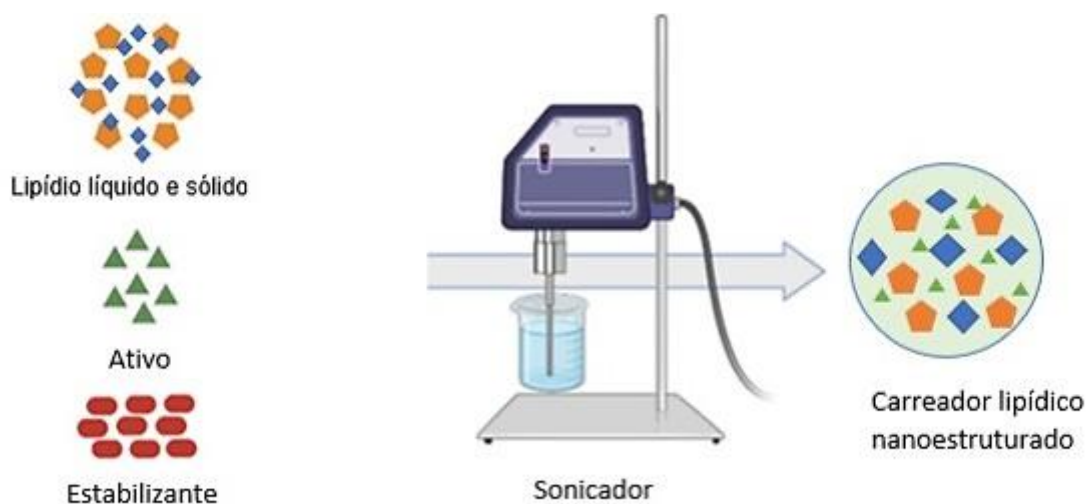
essa suspensão é submetida a um homogeneizador de alta pressão, sendo adequado para materiais que não podem ser submetidos a altas temperaturas (Chauhan *et al.*, 2020; Khan *et al.*, 2022).

- Homogeneização de alta velocidade/cisalhamento - Neste método a submissão a um homogeneizador de alta pressão é substituído por uma alta taxa de cisalhamento, ou seja, após verter a fase aquosa (água e surfactante) na fase lipídica são homogeneizados em homogeneizador em alta rotação ao decorrer de vários minutos, o resultado é resfriado para se obter os carreadores lipídicos nanoestruturados (Chauhan *et al.*, 2020; Khan *et al.*, 2022).
- Microemulsão - Essa técnica consiste na adição após o derretimento do lipídio sólido e do lipídio líquido a fase aquosa contendo água e surfactante e a mistura das fases formando a microemulsão, é uma técnica simples, mas demanda bastante surfactante e cosurfactante (Chauhan *et al.*, 2020; Khan *et al.*, 2022).
- Técnica de difusão e evaporação de solventes - Nesse método o lipídio líquido e o lipídio sólido são dissolvidos por um único solvente orgânico ou por uma combinação de solventes, posteriormente é adicionada a fase aquosa e ultrasonicado, após isso a formulação é mantida em agitação e em baixa temperatura para evaporar o solvente, essa técnica é de baixa intensidade de energia e evita o estresse físico de cisalhamento (Chauhan *et al.*, 2020; Khan *et al.*, 2022).
- Extrusão de fusão a quente - Envolve o uso de bombeamento da fase contendo o lipídio sólido e o ativo em um barril extrusor utilizando um alimentador volumétrico, a fase contendo o lipídio líquido e fase aquosa são adicionadas por uma bomba peristáltica na temperatura de extrusão, essa mistura é extrudada na temperatura de fusão dos componentes, posteriormente essa formulação é sonicada para obter os carreadores lipídicos nanoestruturados (Chauhan *et al.*, 2020; Khan *et al.*, 2022).
- Técnica de injeção de solvente - A técnica consiste na dissolução através de um solvente orgânico da fase lipídica contendo o lipídio líquido e o lipídio sólido com o auxílio do aumento de temperatura, essa fase orgânica obtida é injetada de maneira rápida em uma fase aquosa com água o surfactante em agitação constante,

o tamanho dos nanocarreadores dependerá da difusão do solvente e do conteúdo emulsificante (Chauhan *et al.*, 2020; Khan *et al.*, 2022).

- Técnica de sonicação por fusão a quente - Esse método de obtenção de carreadores lipídicos nanoestruturado é semelhante a técnica de homogeneização a quente de alta pressão, no entanto após a fusão dos lipídios e adicionar a fase aquosa contendo o surfactante e água em agitação posteriormente é substituído o homogeneizador de alta pressão por um sonicador, após isso a formulação é resfriada, nesse método o ativo é adicionado na fase oleosa contendo os lipídios (Figura 8) (Khairnar *et al.*, 2022; Taha *et al.*, 2020).

Figura 8: Técnica de sonicação por fusão a quente



Fonte: Adaptado de Khairnar *et al.*, 2022

2.6.2.2 Lipídios

Lipídio é descrito como uma classe de moléculas que são insolúveis em água (hidrofóbicos) ou alguns são anfifílicos, mas solúveis em solventes apolares como clorofórmio, hidrocarbonetos ou álcoois. Essas moléculas podem ser classificadas em lipídios simples, complexos e derivados, os lipídios simples são moléculas compostas por ácidos graxos e álcoois e podem ser hidrolisados em dois produtos, os lipídios complexos são moléculas que produzem três ou mais grupos depois da hidrólise e incluem fosfolipídios, glicolipídios e esfingolipídios, já os lipídios derivados são resultados da transformação de lipídios simples ou complexos como ácidos graxos livres, esteróis e

álcoois de cadeia linear, os lipídios também podem ser classificados quanto a sua propriedade física em temperatura ambiente (óleos e gorduras) ou por polaridade podendo ser polares e neutros (Apostolou *et al.*, 2021; Ye *et al.*, 2021).

A escolha dos lipídios para obtenção dos carreadores lipídicos nanoestruturados é um dos fatores mais significativos pois afetam no desenvolvimento desses sistemas, tendo em vista que são considerados a solubilidade do ativo utilizado além disso a eficiência de encapsulação é fortemente influenciada na triagem dos lipídios (Apostolou *et al.*, 2021). A solubilidade do ativo tanto no lipídio sólido como no líquido devem ser altas pois isso possibilita que o ativo hidrofóbico permaneça dissolvido na matriz lipídica, a carga do ativo também é considerada pois demonstra a quantidade máxima em que está alojado na matriz lipídica até chegar ao alvo, por isso no processo de desenvolvimento desses carreadores é essencial a triagem de excipientes como os lipídios, somado a isso as variações estruturais e a quantidade de lipídios líquidos utilizados no desenvolvimento desses sistemas também tem grande influência na estabilidade e na taxa de aprisionamento dos fármacos, dentre os lipídios sólidos mais utilizados estão o ácido esteárico, monoestearato de glicerila, dibehenato de glicerila (Compritol®888ATO), palmitoestearato de glicerila (Precirol®ATO5), tristearina (Dynasan®118), já lipídios líquidos os principais estão o ácido oleico, azeites, monocaprilato de propilenoglicol (Capryol™90) e triglicerídeos de cadeia média (Migliol 812) (Apostolou *et al.*, 2021; Ye *et al.*, 2021).

2.6.2.2.1 Ácido esteárico

O ácido esteárico (Figura 9) é um ácido graxo de cadeia longa amplamente presente em muitos óleos e gorduras naturais, possui alta compatibilidade com alimentos e baixa toxicidade, além de uma elevada temperatura de fusão, em torno de 70 °C, esse ácido graxo, juntamente com seus triacilgliceróis correspondentes (tristearina), ou misturas lipídicas ricas nesses compostos, são utilizados amplamente como matrizes lipídicas nas formulações de carreadores lipídicos nanoestruturados (Tang *et al.*, 2023).

Além disso, o ácido esteárico, em comparação com outros lipídios sólidos, possui um baixo ponto de fusão, o que facilita sua utilização em diversas metodologias de fabricação de nanopartículas lipídicas, como homogeneização a quente ou a frio, difusão de solvente e métodos baseados em microemulsão, isso mostra a versatilidade do ácido

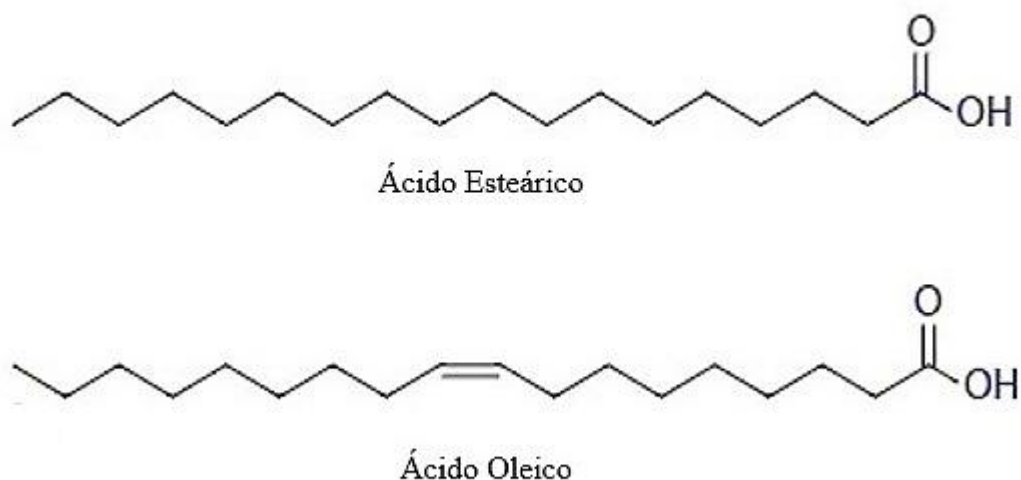
esteárico no processo de encapsulamento de ativos sensíveis ao calor. Por ser um composto de cadeia longa de 18 carbonos, confere maior flexibilidade à estrutura da matriz lipídica, essa flexibilidade possibilita não apenas um melhor ajuste à incorporação de substâncias ativas, mas também um aumento da eficiência de encapsulação e da estabilidade do sistema, como também no controle da liberação dos ativos permitindo uma liberação mais prolongada ou controlada (Kolman *et al.*, 2024; Latifah *et al.*, 2024).

2.6.2.2.2 Ácido oleico

O ácido oleico (Figura 9), um ácido graxo ômega-9 monoinsaturado, é o ácido graxo mais abundante em indivíduos saudáveis, presente no tecido adiposo, plasma e membranas celulares, possui um ponto de fusão relativamente baixo, em torno de 13 a 14 °C, o que contribui para sua natureza líquida à temperatura ambiente, muitos estudos mostram que o ácido oleico traz diversos benefícios à saúde, incluindo a promoção do controle da pressão arterial, a melhoria do perfil lipídico e a proteção cardiovascular. Somado a isso existem evidências de que o ácido oleico desempenha um papel importante na redução da progressão de doenças inflamatórias e no retardamento do desenvolvimento de certos tipos de câncer, graças às suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes (Chen *et al.*, 2019; Tang *et al.*, 2023).

A escolha do ácido oleico como lipídio líquido para o desenvolvimento de carreadores lipídicos nanoestruturados é baseado na sua capacidade de formar uma rede cristalina desordenada, essa característica permite a encapsulação de uma maior quantidade de ativo, além de proporcionar uma maior estabilidade do sistema somado a uma maior capacidade de carga, tendo em vista que minimiza a expulsão do ativo durante a solidificação, permitindo que o sistema armazene concentrações maiores de compostos ativos, pelo fato do ácido oleico ser líquido em temperatura ambiente também possibilita uma maior fluidez da matriz melhorando a dispersibilidade dos carreadores em meio aquoso, resultando em carreadores com menores tamanho e maior estabilidade coloidal (Latifah *et al.*, 2024; Yu *et al.*, 2020).

Figura 9: Estrutura química do ácido esteárico e ácido oleico



Fonte: Adaptado de Buckley *et al.*, 2016

2.6.2.3 Métodos de caracterização físico-química aplicados a nanosistemas

As técnicas para caracterização de nanosistemas e suas propriedades físicas e químicas, como estrutura, morfologia, diâmetro médio, propriedades ópticas e composição, são de extrema importância (Thaher *et al.*, 2021). Dentre as técnicas utilizadas para obter informações sobre a composição química de nanosistemas, a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), aliada a técnica de reflectância total atenuada (ATR), oferece a vantagem de superar as dificuldades relacionadas a interface líquido-sólido, permitindo a análise mais detalhada da superfície de adsorção de nanopartículas, possibilitando a identificação do modo de adsorção, alterações na morfologia e nas estruturas de ligantes, além disso, o uso do ATR-FTIR proporciona uma maior sensibilidade na detecção de interações moleculares na superfície das nanopartículas (Fadlelmoula *et al.*, 2022).

A determinação do diâmetro de nanosistemas em suspensão pode ser feita por meio da técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS), que se tornou um método amplamente utilizado para essa finalidade, no qual avalia o coeficiente de difusão translacional dos nanosistemas dispersos, monitorando as variações na intensidade da luz espalhada, esses dados são convertidos no tamanho das partículas, além de fornecer informações sobre o tamanho das partículas, a técnica também possibilita a análise do índice de polidispersão

e a medição do potencial zeta, parâmetros importantes para avaliar a estabilidade e a homogeneidade nos sistemas nanoparticulados (Ramirez *et al.*, 2021).

Somado a isso, a técnica de difração de raios-X (DRX) é utilizada para analisar estruturas cristalinas, mas também oferece informações sobre o tamanho médio dos cristais, cristalinidade e possíveis deformações, nessa técnica os picos resultam da interferência gerada por feixes de raios-X monocromáticos que são espalhados ao incidir sobre a amostra, a intensidade desses picos pode ser amplificada pela forma como os átomos estão organizados na rede cristalina da amostra (Basak *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2022).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver carreadores lipídicos nanoestruturados contendo o antibiótico norfloxacino e o inibidor de bomba de efluxo, derivado 2-aminotiofênico 6CN-Etil com objetivo de modular a sensibilidade a norfloxacino de linhagens de *Staphylococcus aureus* resistentes que têm como principal mecanismo de resistência à superexpressão de bombas de efluxo.

3.2 Objetivos Específicos

- Preparar carreadores lipídicos nanoestruturados contendo o derivado 2-aminotiofênico 6CN-Etil e norfloxacino;
- Desenvolver e validar um método analítico em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificar o 6CN-Etil e norfloxacino nos carreadores;
- Avaliar a estabilidade dos carreadores lipídicos nanoestruturados ao longo de 90 dias;
- Caracterizar os carreadores lipídicos quanto ao diâmetro médio, potencial zeta, índice de polidispersão, espectroscopia de infravermelho e difração de raio x;
- Avaliar o perfil antimicrobiano, e a capacidade de modulação da resistência ao norfloxacino, do sistema contendo o norfloxacino associado ao derivado 6CN-Etil, frente as cepas de *Staphylococcus aureus* 1199B e K2068, que superexpressam respectivamente bombas de efluxo NorA e MepA.

4. METODOLOGIA

4.1 Materiais

Lipoid® S-100; D-(+)-Trehalose dihydrate 99% (Alfa Aesar, USA); Álcool etílico Absoluto P.A (Dinâmica química, Brasil); Ácido oleico (Gattefossé, França); Ácido esteárico (Gattefossé, França), compritol 888 ato (Gattefossé, França); Precirol ato (Gattefossé, França); Gelucire 44/14 (Gattefossé, França); Gelucire 43/01 (Gattefossé, França); Gelucire 50/13 (Gattefossé, França); Miglyol (Gattefossé, França); Capryol (Gattefossé, França); Labrafac (Gattefossé, França); Transcutol (Gattefossé, França); Enxofre (Sigma, USA); 4-etilciclohexona (Aldrich Sigma, USA); Polyvinyl alcohol (PVA) (Sigma, USA); Malonitrila (Sigma, USA); Trietilamina (Sigma, USA); Acetonitrila grau HPLC (Baker, USA); Membrana de Diálise MWCO 12,000 (Sigma Aldrich, Brazil); Ácido fórmico 85% P.A (VETEC, Brasil); Tween 80 P.A (Sol. Tech, Brasil); Pluronic F68 (Sigma, USA).

4.2 Obtenção do derivado 2-aminotiofênico 6CN-Etil (2-amino-6-etil-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-carbonitrila)

O derivado 2-aminotiofênico 6CN-Etil foi obtido através da reação de Gewald (Sabnis *et al.*, 1999) através da reação em quantidades equimolares de 4-etilciclohexanona, enxofre elementar, e malononitrila em meio etanólico e trietilamina. O precipitado da reação, foi filtrado, e lavado com etanol gelado. A estrutura do componente foi confirmada por ressonância magnética nuclear.

4.3 Determinação de condições para o desenvolvimento dos Carreadores Lipídicos Nanoestruturados

4.3.1 Triagem de lipídios líquidos

Os carreadores lipídicos nanoestruturados são a base de lipídios líquidos e de lipídios sólidos o que os tornam um diferencial em comparação a sistemas mais antigos como as nanopartículas lipídicas sólidas constituídas apenas por lipídios sólidos (Syed *et al.*, 2023). Para selecionar os melhores lipídios líquidos a serem utilizados na formulação, é essencial basear-se na solubilidade dos fármacos nesses lipídios. Nesse estudo foram utilizados na triagem Labrafac Lipophile WL 1349; Transcutol HP; Capryol 90; Miglyol 812; ácido oleico. Foram adicionados a um becker de 10 mL, 500 µL do lipídio líquido em agitação magnética constante de 300 rpm e posteriormente foi vertido 15 mg do fármaco (6CN-Etil ou Norfloxacino), o estudo ocorreu ao decorrer de 24 horas e foram

avaliados quais lipídios solubilizaram o fármaco mais rapidamente, após o tempo pré-determinado a solução foi vertida em uma placa de Petri para visualizar macroscopicamente.

4.3.2 Triagem de lipídios sólidos

Para a determinação de qual lipídio sólido utilizar também é pré-selecionado através da afinidade do fármaco (6CN-Etil ou Norfloxacino) com o lipídio, a triagem consistiu na avaliação dos lipídios sólidos: Compritol 888 ATO; Precirol ATO; Gelucine 44/14; Gelucine 43/01; Gelucine 50/13; ácido esteárico. O método consistiu em adicionar 500 mg do lipídio sólido em becker de 10 mL e aquecer 10°C acima da temperatura de fusão do lipídeo, posteriormente adicionou 5 mg do fármaco (6CN-Etil ou Norfloxacino) sob agitação por 24 horas.

4.3.3 Triagem de Estabilizantes

Neste estudo foram avaliados diferentes estabilizantes, onde foi escolhido o melhor com base no menor diâmetro das partículas e índice de polidispersão, além da aparência macroscópica da formulação, o método utilizado foi o de emulsão a quente por sonicação onde a princípio foi utilizada a proporção 60:40 lipídio sólido:lipídio líquido, no qual a fase oleosa continha 60mg de ácido esteárico e 40mg de ácido oleico, a fase aquosa foi composta pelos diferentes estabilizante e 10mL de água pura tipo 2, a fase aquosa foi vertida na fase oleosa e mantida sob agitação magnética (IKA® C-MAG HS7) por 5 minutos, posteriormente o sistema foi submetido a 3 minutos de sonicação com a amplitude de 35% (SONICADOR ULTRASSÔNICO- Eco Sonics, 550W) e posteriormente foi adicionado 10 mL de água pura tipo 2 gelada para solidificação das nanopartículas (Tabela 2).

Tabela 2: Formulações com variações em proporções e estabilizantes

Formulações	Estabilizantes	Proporção de estabilizante (%)
F1	Pluronic	0,5%
F2	PVA	0,5%
F3	Tween	0,5%
F4	Pluronic	1%
F5	PVA	1%

F6	Tween	1%
F7	Pluronic	3%
F8	PVA	3%
F9	Tween	3%

Fonte: Autor, 2024

4.3.4 Triagem da relação lipídica sólido-líquido

No estudo os carreadores lipídicos nanoestruturados foram preparados a partir de duas fases, uma fase aquosa com 10 mL de água pura tipo II e 1% de PVA, já a fase oleica foram realizadas três formulações variando a proporção de ácido esteárico:ácido oleico (60:40, 50:50 e 70:30), a melhor proporção foi escolhida baseado no menor diâmetro das partículas e índice de polidispersão (Tabela 3).

Tabela 3: Formulações com variações nas proporções lipídica

Formulações	Lipídios Sólido:Líquido	Proporção lipídica
F10	Ácido esteárico: Ácido oleico	70:30
F11	Ácido esteárico: Ácido oleico	60:40
F12	Ácido esteárico: Ácido oleico	50:50

Fonte: Autor, 2024

4.3.5 Triagem da amplitude e tempo de sonicação

O diâmetro das partículas, índice de polidispersão e a aparência macroscópica foram utilizados para determinar a seleção da amplitude e tempo de sonicação o método utilizado foi o de emulsão a quente por sonicação onde a fase oleosa é constituída de ácido esteárico: ácido oleico 60:40, a fase aquosa foi composta por 1% (100 mg) de PVA e 10 mL de água pura tipo 2. Após aquecimento da fase oleosa a 70 °C a fase aquosa foi vertida na fase oleosa sob agitação magnética (IKA® C-MAG HS7) e mantida por 5 minutos. Após está etapa o sistema foi sonicado, o tempo de sonicação variou entre 1 e 5 minutos e a amplitude entre 30% e 70%. Após sonicação as nanopartículas foram solidificadas com a adição de 10 mL de água pura tipo II gelada (Tabela 4).

Tabela 4: Formulações com variações na amplitude e tempo de sonicação

Formulações	Amplitude de sonicação	Tempo de sonicação
F13	30%	1 min
F14	30%	2 min
F15	30%	3 min
F16	30%	4 min
F17	30%	5 min
F18	50%	1 min
F19	50%	2 min
F20	50%	3 min
F21	50%	4 min
F22	50%	5 min
F23	70%	1 min
F24	70%	2 min
F25	70%	3 min
F26	70%	4 min
F27	70%	5 min

Fonte: Autor, 2024

4.3.6 Triagem da concentração de surfactante zwitteriônico

A lecitina é um estabilizante seguro composto de ácidos graxos ligados a glicerol por ésteres fosfatos, amplamente utilizada nas indústrias de alimentos, cosméticos e medicamentos. Além de emulsificar, ela ajuda a manter a uniformidade do tamanho das partículas em dispersões, prevenindo a aglomeração e assegurando uma distribuição estável e homogênea ao longo do tempo (Shi *et al.*, 2023). Nessa etapa, foram preparadas quatro formulações com diferentes concentrações de lecitina na fase oleosa. As formulações foram desenvolvidas utilizando os componentes previamente selecionados: 1% de PVA na fase aquosa, proporção lipídica de 60:40 (ácido esteárico:ácido oleico) e sonicação a 70% de amplitude durante 3 minutos. As amostras foram avaliadas quanto ao diâmetro das partículas, índice de polidispersão e aparência macroscópica, conforme descrito na Tabela 5.

Tabela 5: Formulações com concentrações diferentes de lecitina

Formulações	Surfactante	Proporção
F28	Lecitina	15 mg
F29	Lecitina	25 mg
F30	Lecitina	50 mg
F31	Lecitina	100 mg

Fonte: Autor, 2024

4.5 Obtenção dos carreadores lipídicos nanoestruturados contendo 6CN-Etil e norfloxacino

Os carreadores lipídicos nanoestruturados com 6CN-Etil e norfloxacino (CLN10NOR+106CN) foram obtidos pelo método de emulsão a quente por sonicação onde a fase oleosa foi constituída de ácido esteárico: ácido oleico 60:40 e 25 mg de lecitina aquecidos a 70 °C (10 °C acima da temperatura de fusão do ácido oleico), após o derretimento dos lipídios foram adicionados a fase oleosa 10 mg 6CN-Etil e 10 mg norfloxacino foi aguardado as moléculas solubilizarem, já a fase aquosa foi composta por 1% (100 mg) de PVA e 10 mL de água pura tipo II, a fase aquosa foi vertida na fase oleosa em (IKA® C-MAG HS7) ao decorrer de 5 minutos, posteriormente a formulação foi submetida a sonicação com amplitude de 70% ao decorrer de 3 min (3 ciclos de 1 minuto com intervalo de 30 segundos) em banho de gelo, ao fim do tempo pré-determinado foi adicionado 10 mL de água destilada gelada. As formulações foram transferidas para frascos de penicilina (2 mL em cada frasco) e congeladas para posterior liofilização (Para os carreadores lipídicos nanoestruturados sem fármaco (CLN) não foi acrescido o 6CN-Etil e o norfloxacino).

4.6 Liofilização dos carreadores lipídicos nanoestruturados

A liofilização foi realizada nas formulações CLN e CLN10NOR+106CN em liofilizador (Alpha 1,2 LDplus, CHRIST) com volume de amostra não ultrapassando a altura de 1,5 cm (parâmetro pré-fixado). Foi utilizado a trealose como crioprotetor e foi testada a concentração de 2,5% e a ausência de trealose para o volume de nanopartículas utilizados por tubo (2 mL de amostra/100 mg de trealose). As condições otimizadas para a liofilização foram:

- Pré-congelamento 24 horas em congelador (-20 ± 5 °C);
- Congelamento durante 2 horas a -60 ± 5 °C);
- Liofilização primária durante 24 horas;

Após a liofilização as nanopartículas foram armazenadas em frasco de vidros fechados e mantidas sobre refrigeração para uso posterior.

4.7 Caracterização físico-química dos carreadores lipídicos nanoestruturados

4.7.1 Determinação do tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta

O diâmetro hidrodinâmico e o índice de polidispersão das nanopartículas foram obtidos por espalhamento de luz dinâmico (DLS, Dynamic Light Scattering) em equipamento Zetasizer (Ultra Red, Malvern), as análises foram realizadas em triplicata com ângulo de dispersão de 173° a 25° C. O potencial zeta foi determinado a partir da mobilidade eletroforética sob um campo elétrico. As amostras foram diluídas na proporção de 10 μ L da amostra para 990 μ L de em água pura tipo II e adicionadas em células eletroforéticas com potencial ± 150 mV. Todos os resultados foram apresentados como média e desvio padrão ($\pm$).

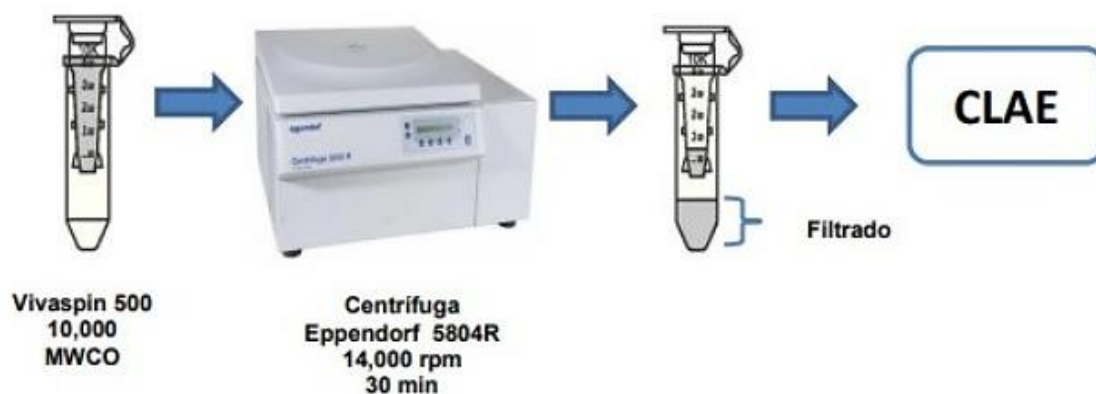
4.7.2 Análise da eficiência de encapsulação (EE)

A avaliação da eficiência de encapsulação dos fármacos foi realizada pelo o método indireto (Figura 10). 500 μ L de CLN10NOR+106CN foi adicionado em tubos VIVASPIN 500 (MWCO 10.000, Sartorius) e submetido a centrifugação (Centrífuga 5804r eppendorf) com rotação de 14 000 rpm durante 30 minutos, após esse período foi coletado 400 μ L do sobrenadante e diluído com acetonitrila, e posteriormente analisado em CLAE. A EE do fármaco foi realizada em triplicata e determinada pela equação 1 (Eq.1).

$$EE = \frac{\text{Quantidade de fármaco encapsulado (mg)}}{\text{Quantidade total de fármaco utilizada (mg)}} \times 100\%$$

(Eq.1)

Figura 10: Método indireto para avaliação da eficiência de encapsulação



Fonte: Adaptado de Galvão, 2019.

4.7.3 Difração de Raios X (DRX)

O grau de cristalinidade foi determinado pela análise de difração de raios X (DRX), obtido usando um difratômetro Smartlab® (Rigaku, Japão), equipado com anodo de cobre, comprimento de onda 1,5443 Å. As amostras foram analisadas no ângulo de difração 2θ na faixa de 5 a 60°, com velocidade de varredura de 5 °/min e passo de 0,03°/s. Os dados foram plotados no Software Origin versão 2018.

4.7.4 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os Espectros de FT-IR foram obtidos em espectrofotômetro pela técnica de refletância total atenuada (ATR) (IR SPIRIT, Shimadzu) na faixa espectral de 4000 a 700 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} .

4.7 Estudo de estabilidade ao longo de 90 dias

O estudo de estabilidade foi realizado para o CLN e CLN10NOR+106CN em suspensão e liofilizado com a adição da trealose na concentração de 2,5%, as amostras foram armazenadas em frasco de vidro fechadas e mantidas refrigeradas a 4 °C durante 90 dias. Ao decorrer do tempo pré-determinado (1, 7, 14, 30, 40, 60 e 90 dias) foram avaliadas as características de diâmetro das partículas, índice de polidispersão e potencial zeta. Para os carreadores liofilizados as amostras foram ressuspensas em 2 mL de água pura tipo 2 com agitação em vórtex.

4.8 Validação do método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O desenvolvimento do método de validação de CLAE foi realizado de acordo com as diretrizes Q2 (R1) da Conferência Internacional sobre Harmonização de Requisitos Técnicos para Produtos Farmacêuticos para Uso Humano (ICH).

4.9.1 Condições cromatograma

As análises cromatográficas foram realizadas no modo isocrático. A fase móvel eluida a um fluxo de 1,8 mL/min. O volume de injeção de amostra foi de 10 µL e o comprimento de onda de detecção de 278 nm (norfloxacin) e 221 nm (6CN-Etil). O tempo de corrida de 7 minutos com temperatura da coluna de 40 °C (Tabela 7).

Os seguintes parâmetros foram utilizados na validação: Fator de retenção (k') não inferior a 2, número de pratos teóricos (NTP) não inferior 1.500 fator caudal não superior a 2,0, e o desvio padrão relativo (DPR%) não superior a 2%

O método analítico foi realizado em um HPLC da Shimadzu (Modelo LC-20A Prominence) equipado com um detector de PDA e UV-Vis e uma coluna de sílica (Shim-pack GIST C18, 5 µm x 250 mm x 4,6 mm) e a fase móvel foi composta por acetonitrila e água acidificada em modo isocrático. Os resultados obtidos foram analisados utilizando o software de dados de cromatografia *LabSolutions*. Posteriormente, foi realizado o teste de adequação do sistema para confirmar o funcionamento do sistema de cromatografia.

Tabela 7: Condições cromatográficas

Fase Móvel	Vol.de injeção	Comp. de onda	Fator caudal	Pratos teóricos	Temperatura da coluna	Tempo de corrida
ACN:H 20 60:40	10 µl 1,8 mL/min	278 nm/ 221 nm	Menor que 2	Inferior a 1500	40 °C	7min

Fonte: Autor, 2024

4.9.2 Adequação do sistema

Para análise de adequação do sistema, uma amostra com concentração definida foi utilizada, injeções repetidas desta solução foram analisadas. A partir destas análises foram analisados os critérios de área do pico, tempo de retenção e o número de pratos teóricos.

4.9.4 Preparação da fase móvel

Previamente foi preparado uma solução de 999 mL de água ultrapura e 1mL de ácido fórmico em uma proveta de 1L e ajustado o pH para 3,0; posteriormente a solução foi filtrada e acondicionada em recipiente de vidro.

Em uma balança analítica foram pesados 25 mg dos fármacos (6CN-Etil ou norfloxacino) e posteriormente diluídos com acetonitrila 100% ou ACN: Água acidificada (60:40) em balão volumétrico de 25 ml para formar uma solução a 1mg/mL. Em seguida, a solução foi submetida a banho de ultrassom durante 5 minutos e filtrada com um filtro de 0,22 μ M. Estas soluções foram utilizadas para preparar as soluções para construção da curva de calibração.

4.9.5 Linearidade

A linearidade foi observada a partir da curva analítica com sete níveis de concentração: 6, 8, 10, 12, 14 e 16 μ g/mL em triplicata. Os resultados foram plotados em regressão linear, no eixo x concentrações versus eixo y com as áreas dos picos. O coeficiente de correlação (r) deve estar acima de 0,990 com nível de significância de 5%, e DPR% até 2%.

4.9.6 Precisão

A precisão foi expressa numericamente por meio da estimativa da área do pico e do desvio padrão relativo (DPR), também conhecido como coeficiente de variação (CV%), de uma série de repetições da mesma amostra, em diferentes preparações e dois analistas diferentes. Na análise da precisão foi realizado os cálculos de precisão (repetibilidade) com os dados da triplicata da linearidade de um ponto baixo (8 μ g/mL), um médio (10 μ g/mL) e um alto (14 μ g/mL) da curva. O experimento foi realizado em três níveis de precisão: a repetibilidade (precisão intra-corrida) foi realizada com leituras em triplicatas das concentrações definidas por dois analistas; e a precisão intermediária (inter-corrida) conduzida por dois analistas e em dias distintos. Por fim, a precisão foi expressa em desvio padrão relativo percentual (DPR %).

4.9.7 Seletividade

Para o ensaio de seletividade foram preparados os carreadores lipídicos nanoestruturados obtidos pelo método de emulsão a quente por sonicação (sem os fármacos). Posteriormente, foram submetidas à centrífuga 20000 rpm durante 20 minutos; posteriormente coletado sobrenadante e feito a diluição de 500 μ L em 5 mL no balão volumétrico com acetonitrila; a amostra foi filtrada e a solução resultante analisada por

CLAE. Foram preparadas três soluções padrões do fármaco (6CN-Etil e norfloxacino). As soluções padrões foram na concentração 100 µg/mL. Em um balão de 5mL, foi adicionado 500 µL do sobrenadante mais 500 µL de cada padrão E as leituras foram realizadas nas condições padronizadas.

4.9.8 Exatidão

A exatidão do método foi obtida a partir dos dados do ponto baixo (8 µg/mL), médio (10 µg/mL) e alto (14 µg/mL) da linearidade, e realizado os cálculos de exatidão, com desvio padrão aceitável até 2%.

4.9.9 Robustez

As análises foram realizadas por *single run* para variação dos parâmetros pré-selecionados após desenvolvimento do método (Tabela 8).

Tabela 8: Parâmetros escolhidos para a robustez

<i>Run</i>	Vol. Amostra	Temperatura	Fluxo de fase móvel	Proporção fase móvel
1	10 µg/mL	40°C	1,8	60:40
2	10 µg/mL	40°C	1,9	60:40
3	10 µg/mL	40°C	2,0	60:40
4	10 µg/mL	38°C	1,8	60:40
5	10 µg/mL	40°C	1,8	60:40
6	10 µg/mL	42°C	1,8	60:40
7	10 µg/mL	40°C	1,8	60:40
8	10 µg/mL	40°C	1,8	65:35
9	10 µg/mL	40°C	1,8	55:25

Fonte: Autor, 2024

4.9.10 Limites inferiores de detecção (LID) e de quantificação (LIQ)

Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram calculados através da determinação da relação sinal-ruído

Limite de Detecção:

- Realizada comparando os sinais medidos de amostras com baixas concentrações conhecidas de analito com os de amostras em branco (nanopartícula branca) e

estabelecendo a concentração mínima na qual o analito pode ser detectado com segurança.

- Uma relação sinal-ruído entre 3 ou 2:1 é geralmente considerada aceitável para estimar o limite de detecção.

$$LD = \frac{3,3 \cdot \sigma}{IC}$$

IC é a inclinação da curva de calibração, σ é o desvio padrão

Limite de Quantificação

- Análise em branco, que é uma amostra que não contém o analito de interesse, usando as mesmas condições cromatográficas que serão usadas para as amostras no teste de seletividade;
- Obtenção do Ruído de Fundo:
- Após a análise em branco, foi identificado a região do cromatograma que representa o ruído de fundo.
- Medir os valores do sinal nessa região.

$$LQ = \frac{\sigma \cdot 10}{IC}$$

4.10 Avaliação da atividade moduladora de antibióticos em cepas portadores de bombas de efluxo

4.10.1 Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM)

A verificação da potencialização de antibióticos em cepas de *Staphylococcus aureus* que superexpressam bombas de efluxo foi realizada pelo método de microdiluição em caldo com verificação da redução da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da norfloxacina, frente às cepas de *Staphylococcus aureus* 1199B e *S. aureus* K2068, cepas que superexpressam as bombas de efluxo NorA e MepA, respectivamente. Foram preparados inóculos bacterianos das duas cepas em solução salina estéril, de acordo com a escala 0,5 de McFarland correspondendo a $1,5 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colônias. Foram testados seis grupos: 6CN-Etil livre, CLN, Norfloxacina livre (controle negativo), mistura física 6CN-Etil+Norfloxacina (uma solução preparada com 500 µg/mL de 6CN-Etil e de norfloxacina), CCCP (Cianeto de carbono m-clorofenilhidrazona) +

Norfloxacino (controle positivo) e CLN10NOR+106CN que consistiu na amostra teste contendo 500 µg/mL de 6CN-Etil e de Norfloxacino no nanocarreador. Foram preparados os meios de diluição em microtubos contendo 900 µL de meio de cultura Brain Heart Infusion (BHI) e 100 µL do inóculo bacteriano. 100 µL do conteúdo dos tubos foram transferidos para placa de microdiluição de 96 poços. Posteriormente, realizou-se a microdiluição seriada (1:1) com 100 µL das substâncias de cada grupo testado.

A microdiluição ocorreu até a penúltima cavidade, deixando a última cavidade como controle de crescimento. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica 24 h a 37 °C. Os experimentos foram realizados em triplicatas. A leitura foi realizada pela adição de 20 µL de resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido), observando-se a mudança de coloração do meio em cada poço. A coloração azul indicou ausência de crescimento bacteriano e variação de coloração para vermelho indicou crescimento bacteriano. Ao final comparou-se a CIM do norfloxacino livre versus CIM da CLN10NOR+106CN além de comparar 6CN-etil+Norfloxacino versus o carreador CLN10NOR+106CN (CLSI, 2019). Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados comparados através da One-way ANOVA, seguido por Dunnett *post hoc*. Os resultados foram expressos em média geométrica ± erro padrão da média (SEM) sendo considerados significativos os valores quando $P < 0.05$. Foi utilizado o software GraphPad Prism 5.0.

4.11 Análise Estatística

Todos os dados foram apresentados como média ± desvio padrão, com os experimentos realizados em triplicata. Para verificar a normalidade dos dados, aplicou-se o teste de Shapiro-Wilk. Para as comparações entre os grupos, foi utilizada a análise de variância bidirecional (ANOVA), seguida pelo teste pós-hoc de Tukey, considerando um valor de $p < 0,05$ como indicador de significância estatística.

5. RESULTADOS

5.1 Determinação de condições para o desenvolvimento dos Carreadores Lipídicos Nanoestruturados

5.1.1 Triagem lipídios líquidos

Os lipídios líquidos são o diferencial entre as nanopartículas sólidas e os carreadores lipídicos nanoestruturados, pois geralmente estão misturados com lipídios sólidos, possuem baixo ponto de fusão e conferem uma formação de matriz imperfeita que contribui para o aumento da incorporação de fármacos e bioativos na matriz, normalmente é utilizado os triglicerídeos de cadeia média, ácido oleico e óleos naturais (Tang *et al.*, 2023). No estudo realizado, a seleção do lipídio líquido foi baseada na solubilidade do norfloxacino e do 6CN-Etil nos lipídios Labrafac lipophili w/1349, Transcutol HP, Capryol 90, Miglyol e Acido oleico. Foram adicionados 15 mg do derivado 2-amino-tiofênico 6CN-Etil para 500 μ L do lipídio líquido e foram observados após 24 horas os aspectos visuais da mistura em uma placa de Petri, o 6CN-etil solubilizou bem ao fim do tempo pré-determinado em todos os lipídios líquidos, mas ao decorrer das primeiras horas do estudo notou-se que o ácido oleico iniciou a solubilização mais rapidamente do que os outros lipídios, seguido pelo transcutool (Figura 11).

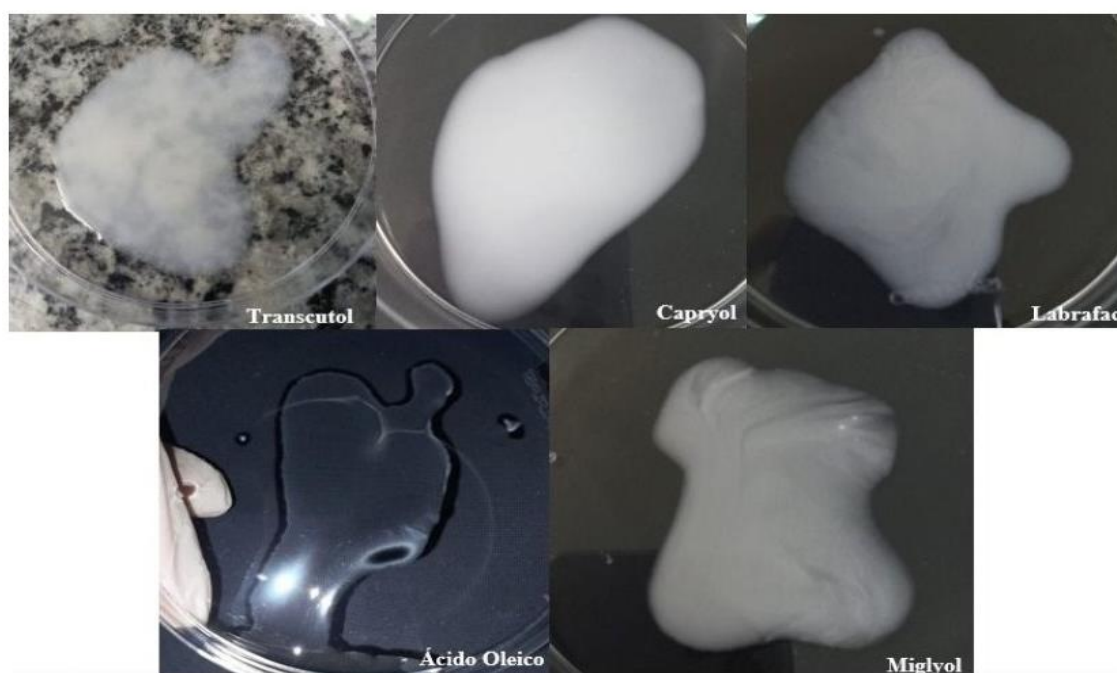
Figura 11: Triagem de lipídios líquidos do 6CN-Etil



Fonte: Autor, 2023

Já o norfloxacin, após as 24 horas ao fim da triagem foi observado que o antimicrobiano não solubilizou bem em quatro lipídios líquidos sendo somente solúvel completamente no ácido oleico desde as primeiras horas do início do estudo (Figura 12). O efeito do lipídio líquido como o ácido oleico já foi relatado em outros estudos que auxilia no ajuste da solubilidade de fármacos melhorando o encapsulamento e a eficiência de carga (Eleraky *et al.*, 2020).

Figura 12: Triagem de lipídios líquidos do norfloxacin



Fonte: Autor, 2023

5.1.2 Triagem lipídios sólidos

Os lipídios sólidos possuem um papel bastante importante para a composição do núcleo dos carreadores lipídicos nanoestruturados e podem acarretar em alterações nas características e propriedades que podem provocar alterações do sistema, em estudos anteriores foi relatado que as propriedades de diâmetro das partículas, potencial zeta, índice de polidispersão, eficiência de encapsulação e liberação do fármaco é totalmente relacionada com a seleção adequada dos lipídios para ser utilizado nos carreador lipídico nanoestruturados (Galvão., 2019). A triagem foi realizada para selecionar o lipídio sólido baseada na solubilidade do norfloxacin e do 6CN-Etil nos lipídios, sendo eles: Compritol 888 ATO, Precirol ATO, Gelucine 44/14, Gelucine 43/01, Gelucine 50/13 e Ácido esteárico.

Os estudos foram realizados ao decorrer de 24 horas e aquecidos de acordo com o ponto de fusão de cada lipídio sólido (Somado mais 10 °C), o 6CN-Etil solubilizou rapidamente no ácido esteárico seguido pelo Gelucire 43/01, já o norfloxacino na mesma concentração do derivado tiofênico solubilizou por completo no ácido esteárico. Nanopartículas lipídicas baseadas em ácidos graxos de cadeia média como o ácido esteárico não precisam ser submetidas a altas temperaturas para solubilizarem durante a preparação, além de ser um lipídio de ótimo custo-benefício, fornece uma flexibilidade na matriz do carreador o que confere a oportunidade de incorporar maior quantidade de fármacos (Pereira *et al.*, 2023).

5.1.3 Triagem de Estabilizantes

Os carreadores lipídicos nanoestruturados são formulados a partir de uma mistura de lipídios líquidos e sólidos em sua fase oleosa, mas essas partículas tendem a aglomerar, para superar esse problema podem ser adicionados estabilizantes em uma fase aquosa, essas moléculas atuam como umectantes, detergentes e emulsificantes, a presença de um estabilizante compatível influencia positivamente no tamanho das partículas, no índice de polidispersão, além da estabilidade física aparente (Cortés *et al.*, 2021). Nesse estudo as formulações foram realizadas a partir do método de emulsão a quente por sonicação e preparadas 9 formulações variando o tipo de estabilizante e a concentração dos mesmos, foram testados PVA (0,5%, 1,0% e 3,0%), Pluronic (0,5%, 1,0% e 3,0%) e Tween (0,5%, 1,0% e 3,0%), onde foram considerados além da estabilidade macroscópica também os tamanhos das partículas e o índice de polidispersão (Tabela 9).

Tabela 9: Diâmetro das partículas e índice de polidispersão de formulações com diferentes estabilizantes

Formulações	Estabilizantes	Diâmetro das partículas	Índice de Polidispersão
F1	Pluronic 0,5%	268,10 ($\pm 6,38$) *****	0,3856 ($\pm 0,02$) *****
F2	PVA 0,5%	601,47 ($\pm 5,77$) *****	0,3264 ($\pm 0,01$) *****
F3	Tween 0,5%	329,77 ($\pm 5,09$) **	0,3042 ($\pm 0,03$) ***
F4	Pluronic 1,0%	353,37 ($\pm 1,65$) **	0,1988 ($\pm 0,01$) *****
F5	PVA 1,0%	336,13 ($\pm 2,26$) **	0,2492 ($\pm 0,01$) *****
F6	Tween 1,0%	382,07 ($\pm 2,94$) **	0,3043 ($\pm 0,01$) ***
F7	Pluronic 3,0%	322,50 ($\pm 0,35$) **	0,1719 ($\pm 0,01$) *****

F8	PVA 3,0%	407,67 ($\pm 1,10$) **	0,2047 ($\pm 0,02$) ****
F9	Tween 3,0%	1283,00 ($\pm 84,86$)	0,7685 ($\pm 0,02$)

Fonte: Autor, 2023

** P < 0,01; *** P < 0,001; **** P < 0,0001

As formulações com 1,0% de estabilizante apresentaram tamanhos variando entre 382- 336 nm e os valores de índice de polidispersão entre 0,1-0,3, no entanto o PVA na concentração de 1,0% apresentou o melhor resultado em relação ao diâmetro das partículas e índice de polidispersão (Tabela 9), além disso também foi considerado a aparência macroscópica das formulações, os carreadores com o estabilizante Tween e com Pluronic apesar da concentração de 0,5% ter apresentado um bom tamanho de partículas de 268 nm, as formulações apresentaram separação de fase na formulação com Tween e aglomerados de lipídios nas formulações com Pluronic após a preparação. Devido a estes resultados o PVA foi selecionado como estabilizante, este é um polímero biocompatível, biodegradável, flexível e não tóxico e possui a capacidade de formar nanopartículas pequenas e com distribuição uniforme de tamanho tornando um candidato excelente para aplicações na área da saúde (Cortés *et al.*, 2021).

A análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey, demonstrou diferença significativa no tamanho das partículas entre a formulação com 3% de Tween (F9) e as formulações F3, F4, F5, F6, F7 e F8 (P < 0,01). Além disso, a diferença foi altamente significativa (P < 0,0001) em relação às formulações F1 e F2. Quanto ao PDI, a F9 apresentou diferença altamente significativa (P < 0,0001) em comparação a todas as formulações, exceto F3 e F6, que apresentaram diferença significativa de P < 0,001. Além disso, a F9 apresentou separação de fase após o armazenamento, indicando menor estabilidade física, podendo justificar as diferenças altamente significativas entre as formulações.

5.1.4 Triagem da relação lipídica sólido-líquido

A seleção do tipo e da proporção dos lipídios líquidos e sólidos somados a combinações dos outros componentes e sua compatibilidade são bastante importantes para definir maior capacidade de carga, liberação controlada, biodisponibilidade do ativo e na organização da matriz do carreador lipídico nanoestruturado (Sakellari *et al.*, 2021).

Tabela 10: Diâmetro das partículas e índice de polidispersão de formulações com diferentes proporções de ácido esteárico:ácido oleico

Formulações	Ácido esteárico: Ácido oleico	Diâmetro das partículas	Índice de polidispersão
F10	70:30	473,10 ($\pm 4,57$) ****	0,3470 ($\pm 0,02$) **
F11	60:40	336,13 ($\pm 2,26$) ****	0,2492 ($\pm 0,01$)
F12	50:50	396,80 ($\pm 3,05$) ****	0,2185 ($\pm 0,01$) **

Fonte: Autor, 2024

** P < 0,01; **** P < 0,0001

Na tabela 10 foi observado que a formulação com maior proporção do lipídio sólido o ácido esteárico (70:30) apresentou o maior diâmetro das partículas com 473 nm e índice de polidispersão de 0,34, já na formulação com a proporção 50:50 quando houve o aumento da concentração lipídio líquido corroborou para a diminuição do diâmetro das partículas para 396 nm e o índice de polidispersão para 0,21, no entanto na formulação 60:40 foi proporcional ao decrescimento do tamanho das partículas para 336 nm e índice de polidispersão 0,24, demonstrando que a estabilidade da suspensão é relacionada com o aumento da quantidade de lipídio líquido na matriz mas também correlacionada com proporção do lipídio sólido o que confere uma maior estabilidade, pois provavelmente essa proporção somado com a concentração escolhida do PVA reduziu a viscosidade e a tensão superficial das gotículas lipídicas resultado em um menor tamanho, por isso a formulação contendo a proporção dos lipídios 60:40 foi escolhida para seguir os próximos testes (Sakellari *et al.*, 2021).

A análise ANOVA, seguida pelo teste de Tukey, revelou diferenças altamente significativas ($P < 0,0001$) no tamanho das partículas entre as formulações com proporções de 60:40 e 50:50, bem como entre as proporções 60:40 e 70:30, e entre 50:50 e 70:30. Além disso, observou-se diferenças significativas no PDI entre as formulações 60:40 e 70:30, e entre 70:30 e 50:50, com $P < 0,01$. Esses resultados destacam a influência das proporções de lipídios sobre o tamanho das partículas e a uniformidade da suspensão, reforçando a importância dessas da seleção dessas variáveis na formulação

5.1.5 Triagem da amplitude e tempo de sonicação

De acordo com a literatura, determinadas concentrações de lipídios líquidos e sólidos com a adição de estabilizantes requerem maior amplitude (energia) de sonicação, para que haja a “quebra” eficaz. e formação de nanopartículas, O diâmetro das partículas

e índice de polidispersão estão atrelados a quantidade de energia fornecida na formulação por meio da sonicação e o tempo da exposição, mas existe um limite durante a exposição do sistema a sonicação pois se tornar um fator prejudicial para os mesmos parâmetros (Souza, 2022). Foram realizadas formulações variando a amplitude e o tempo de sonicação e foram avaliados o tamanho das partículas e o índice de polidispersão, bem como a aparência macroscópica (Tabela 11).

Tabela 11: Diâmetro das partículas e índice de polidispersão de formulações variando o tempo e a amplitude de sonicação

Formulações	Amplitude/Tempo de sonicação	Tamanho das partículas	Índice de polidispersão
F13	30% / 1 min	614,33 ($\pm 331,72$)	0,6647 ($\pm 0,18$)
F14	30% / 2 min	403,97 ($\pm 208,97$)	0,4165 ($\pm 0,11$)
F15	30% / 3 min	238,90 ($\pm 9,37$)	0,5166 ($\pm 0,03$)
F16	30% / 4 min	262,63 ($\pm 115,88$)	0,4593 ($\pm 0,11$)
F17	30% / 5 min	201,97 ($\pm 31,21$) *	0,3512 ($\pm 0,01$) **
F18	50% / 1 min	300,77 ($\pm 3,70$)	0,3916 ($\pm 0,03$) *
F19	50% / 2 min	171,93 ($\pm 0,93$) *	0,2207 ($\pm 0,006$) ****
F20	50% / 3 min	170,17 ($\pm 1,11$) *	0,2206 ($\pm 0,04$) ****
F21	50% / 4 min	177,73 ($\pm 1,88$) *	0,2734 ($\pm 0,03$) ***
F22	50% / 5 min	164,90 ($\pm 0,32$) *	0,1779 ($\pm 0,01$) ****
F23	70% / 1 min	299,60 ($\pm 2,27$)	0,2138 ($\pm 0,01$) ****
F24	70% / 2 min	214,53 ($\pm 3,25$) *	0,2222 ($\pm 0,007$) ****
F25	70% / 3 min	184,47 ($\pm 2,71$) *	0,2909 ($\pm 0,03$) ***
F26	70% / 4 min	261,83 ($\pm 3,63$)	0,3049 ($\pm 0,03$) ***
F27	70% / 5 min	206,17 ($\pm 1,21$) *	0,338 ($\pm 0,02$) **

Fonte: Autor, 2024

*P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001; **** P < 0,0001

Nota-se na tabela 11 que praticamente todas as formulações seguem o mesmo padrão, de acordo com o aumento do tempo de sonicação ocorre a diminuição do tamanho das partículas (exceto as com 70%) e isso já é mostrado na literatura que esses fatores são proporcionais e empregados para a uniformidade do sistema ao decorrer do tempo, no entanto maiores tempos de sonicação em baixa amplitude expõe a formulação a estresses, pois apesar que formem partículas menores, elas são mais instáveis e resultam em agregação das partículas, coalescência e até mesmo oxidação dos lipídios, por isso uma sonicação em amplitudes mais elevadas garantiu um diâmetro de partículas pequeno e

com um bom valor de PDI, garantindo que essa amplitude alta seja suficiente para garantir resultados eficientes sem a necessidade de muitos minutos e a exposição ao aquecimento excessivo do sistema, logo a formulação escolhida foi a com a amplitude de sonicação de 70% durante 3 minutos pois apresentou o diâmetro das partículas de 184,47 nm e o índice de polidispersão de 0,29, somado a isso a formulação não apresentou aglomerados e nem separação de fases, como observado em potências mais baixas (Al-haj *et al.*, 2024; Souza., 2022).

Foi realizada uma análise ANOVA one-way para avaliar as diferenças no diâmetro das partículas entre as formulações, considerando a amplitude e tempo de sonicação como fatores em relação ao diâmetro das partículas, foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) entre a formulação com amplitude de 30% e tempo de 1 minuto de sonicação (F13) e as demais formulações sinalizadas (*) na Tabela 11. Quanto ao PDI, observou-se uma diferença altamente significativa de $P < 0,0001$ entre a F13 e as formulações F19, F20, F22, F23 e F24, que apresentaram combinações diferentes de amplitude e tempo de sonicação. Além disso, foram encontradas diferenças significativas ($P < 0,001$) entre a F13 e as formulações F21, F25, F26, e ($P < 0,01$) em comparação com a F17. Essas variações nas condições de sonicação influenciaram de forma significativa tanto o diâmetro das partículas quanto o PDI das formulações, destacando a importância desses parâmetros na preparação das partículas.

5.1.6 Triagem da concentração de surfactante ziwteriônico

Apesar das vantagens das nanopartículas lipídicas, um importante limitante destes sistemas é sua estabilidade. A lecitina é um tensoativo ziwteriônico que pode prevenir a agregação das partículas de forma mais eficiente, ela possui em sua estrutura um fosfolípido na parte polar e uma cauda lipofílica, que dependendo do pH, pode gerar uma maior repulsão entre as partículas prevenindo a agregação e garantindo a estabilidade (Castro *et al.*, 2021; Tang *et al.*, 2023). Diferentes concentrações de lecitina foram adicionadas à formulação com o objetivo de mitigar problemas relacionados à estabilidade e ao tempo de prateleira (Tabela 12).

Tabela 12: Diâmetro das partículas e índice de polidispersão das formulações variando a concentração de lecitina

Formulações	Lecitina	Diâmetro das partículas	Índice de polidispersão
F28	15 mg	276,13 ($\pm 16,49$)	0,3414 ($\pm 0,008$)
F29	25 mg	233,43 ($\pm 3,48$)	0,2500 ($\pm 0,01$) *
F30	50 mg	269,47 ($\pm 14,75$)	0,4490 ($\pm 0,01$)
F31	100 mg	298,20 ($\pm 38,88$)	0,5041 ($\pm 0,14$) *

Fonte: Autor, 2024

*P < 0,05

De acordo com a tabela 12, dentre as quatro formulações testadas com diferentes concentrações de lecitina, a formulação contendo 25 mg apresentou os melhores resultados, exibindo um diâmetro médio de partículas de 233,43 nm e um índice de polidispersão de 0,25, mas ao aumentar a concentração de lecitina, notou-se um aumento no diâmetro das partículas e no índice de polidispersão, indicando uma possível saturação do sistema. O teste ANOVA one-way, seguido pelo teste de Tukey, não revelou diferenças significativas entre os grupos quanto ao tamanho das partículas.

No entanto, em relação ao PDI, foi observada uma diferença significativa ($P < 0,05$) entre a formulação com 25 mg de lecitina e aquela contendo 100 mg do surfactante. O estudo de Schubert *et al.* (2006) demonstrou que a lecitina influencia o diâmetro das nanopartículas lipídicas de forma dependente da concentração. Inicialmente, o aumento da lecitina levou à redução do diâmetro das partículas, no entanto, após certo limite, o aumento da concentração de lecitina não resultou em diminuição adicional e foi concluído que isso ocorre devido ao seu caráter anfifílico, atua na interface das partículas e que em altas concentrações, pode levar à instabilidade.

5.2 Obtenção dos carreadores lipídicos nanoestruturados contendo 6CN-Etil e Norfloxacino

No presente estudo, foram avaliadas diferentes concentrações de Norfloxacino e 6CN-Etil para otimizar os carreadores lipídicos nanoestruturados, com o objetivo de determinar a quantidade ideal de fármaco a ser utilizada, os carreadores foram obtidos pelo método de emulsão a quente por sonicação baseado nos resultados dos estudos de triagem de excipientes. Foram considerados os valores do diâmetro das partículas e índice de polidispersão, as formulações com 5 mg do antibiótico e do derivado tiofênico e com 10 mg de cada molécula apresentaram diâmetro das partículas pequenos e valores de

índice de polidispersão baixo, indicando uma distribuição homogênea das partículas e sugerindo que ambas as formulações são bastantes viáveis, além disso, não houveram diferenças significativas entre as formulações, ao realizar ANOVA e teste de Tukey.

No entanto pelo fato da formulação contendo 10 mg de cada molécula ter uma maior quantidade total de Norfloxacino e 6CN-Etil, pode ser vantajoso para a atividade antimicrobiana da formulação, tendo em vista que concentrações mais altas do inibidor de bomba de efluxo (6CN-Etil) poderiam potencializar a atividade antimicrobiana e aumentar a retenção do norfloxacino intracelular potencializando o seu efeito (Freire *et al.*, 2018) (Tabela 13).

Tabela 13: Diâmetro das partículas e índice de polidispersão de formulações variando a concentração do norfloxacino e 6CN-Etil

Formulações	Norfloxacino+6CN-Etil	Diâmetro das partículas	Índice de polidispersão
CLN5NOR+56CN	5 mg + 5 mg	208,83 ($\pm 0,09$)	0,19 ($\pm 0,03$)
CLN10NOR+106CN	10 mg + 10 mg	217,70 ($\pm 2,42$)	0,29 ($\pm 0,03$)

Fonte: Autor, 2024

Somado a isso, carreadores com maiores concentrações dos ativos garantem uma entrega mais eficaz das moléculas reduzindo a quantidade de doses e otimizando o processo de tratamento (Galvão., 2019). Apesar de ambas as formulações exibirem um bom tamanho de partículas e índice de polidispersão, a formulação CLN10NOR+106CN foi selecionada para os estudos seguintes.

5.3 Liofilização dos carreadores lipídicos nanoestruturados

As formulações CLN e CLN10NOR+106CN foram liofilizadas com a adição de trealose (2,5%) e sem o crioprotetor. Podemos observar que após a liofilização sem adição de trealose os carreadores aumentaram o diâmetro das partículas em mais de 3 vezes e o índice de polidispersão ficou maior que 0,5, indicando que o processo de liofilização acarretou instabilidade física e agregação das partículas e aumento do tamanho, em comparação aos carreadores em suspensão, após a adição da trealose foi observado tamanhos menores de partículas e índice de polidispersão, principalmente na concentração de 2,5% de trealose, indicando a importância da adição da trealose para

manter a estabilidade dos carreadores lipídicos nanoestruturados. Apesar da liofilização ser um processo para melhorar a estabilidade física e química de nanopartículas, o processo de congelamento seguido pela remoção de água pode ocasionar estresses as nanopartículas, por isso se torna necessário a adição de excipientes como crio/lioprotetores para diminuir esses impactos, afim de manter a estabilidade química e física diminuindo a agregação e evitando a tensão entre as partículas, geralmente os mais utilizados são açúcares ou polímeros como a trealose, manitol, sorbitol, manose, álcool polivinílico, glicose, dextrana, glicerol, frutose, sacarose e ciclodextrina (Trenkenschuh *et al.*, 2021). A trealose é um dos crioprotetores mais utilizados, graças a suas vantagens de possuir menor higroscopicidade, menos interação química e ausência de ligações de hidrogênio intramoleculares, formando ligações de hidrogênio mais flexíveis com as nanopartículas durante o processo de liofilização (Veider *et al.*, 2022).

A análise ANOVA foi utilizada para comparar os grupos em relação ao tamanho das partículas e ao PDI. Na Tabela 14, observou-se uma diferença altamente significativa ($P < 0,0001$) entre os CLN sem trealose em comparação com a formulação antes da liofilização e após a liofilização com a adição de trealose. Para o índice de polidispersão, a diferença entre esses mesmos grupos foi significativa ($P < 0,01$). Na Tabela 15, os CLN10NOR+106CN liofilizados sem trealose em comparação com o carreador em suspensão e após a liofilização com adição do crioprotetor apresentou uma diferença significativa no tamanho das partículas de $P < 0,001$), enquanto para o índice de polidispersão a diferença foi de $P < 0,05$.

Tabela 14: Diâmetro das partículas, índice de polidispersão e tempo de ressuspensão dos CLN sem fármacos antes e após a liofilização com e sem adição de trealose

Formulações	Diâmetro das partículas	Índice de polidispersão	Tempo de ressuspensão (manual/vórtex)
Antes da liofilização	222,07 ($\pm 4,17$) ****	0,37 ($\pm 0,01$) **	-
Após liofilização 0% trealose	780,83 ($\pm 50,71$)	0,80 ($\pm 0,11$)	1 min / 2 min (vórtex)
Após liofilização 2,5% trealose	203,23 ($\pm 8,47$) ****	0,31 ($\pm 0,02$) **	1 min / 2min (vórtex)

Fonte: Autor, 2024

** $P < 0,01$; **** $P < 0,0001$

Tabela 15: Diâmetro das partículas, índice de polidispersão e tempo de ressuspensão dos CLN10NOR+106CN antes e após a liofilização com a adição de trealose

Formulações	Diâmetro das partículas	Índice de polidispersão	Tempo de ressuspensão (manual/vórtex)
Antes da liofilização	217,7 ($\pm 0,02$) ***	0,294 ($\pm 0,02$) *	-
Após liofilização 0% trealose	617,5 ($\pm 0,06$)	0,566 ($\pm 0,06$)	1 min / 4 min (vórtex)
Após liofilização 2,5% trealose	244,4 ($\pm 0,009$) ***	0,31 ($\pm 0,009$) *	1 min / 4 min (vórtex)

Fonte: Autor, 2024

*P < 0,05; *** P < 0,001

5.4 Caracterização físico-química dos carreadores lipídicos nanoestruturados

5.4.1 Análise da eficiência de encapsulação (EE%)

A análise da EE% do presente estudo foi determinada pelo método indireto, apresentando EE% de 99,50% e 90,91% para o 6CN-Etil e o norfloxacino, respectivamente. Estes resultados evidenciam a capacidade dos carreadores lipídicos nanoestruturados em encapsulação estas moléculas, tendo em vista que valores de EE% maiores que 60% geralmente indicam a eficácia no processo de preparação dos carreadores relacionados a quantidade adequada de fármaco nas partículas lipídicas (Haider *et al.*, 2020).

Geralmente os resultados da eficiência de encapsulação são afetados por parâmetros da formulação como tipos de lipídios líquidos e sólidos e concentração. Estudos anteriores mostraram que concentrações crescentes de ácido oleico levaram a uma eficiência de encapsulação crescente, o ácido oleico altera a estrutura cristalina da matriz dos carreadores, aumentando suas imperfeições garantindo uma maior EE% (Haider *et al.*, 2020; Latifah *et al.*, 2024). Além disso, a combinação de ácidos graxos como o ácido oleico e o ácido esteárico podem otimizar essa propriedade de eficiência de encapsulação, o ácido oleico favorece a incorporação de moléculas hidrofóbicas devido a solubilidade, já o ácido esteárico contribui para uma estrutura mais estável, reduzindo a perda do fármaco durante a preparação e o armazenamento (Latifah *et al.*, 2024; Woo *et al.*, 2014). Dessa forma, o estudo demonstrou uma alta eficiência de encapsulação dos carreadores lipídicos nanoestruturados. Esses resultados destacam a importância de uma formulação

otimizada para sistemas de liberação controlada e maior biodisponibilidade dos medicamentos.

5.4.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Foram analisados por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier acoplado com ATR os componentes da formulação: ácido oleico, ácido esteárico, PVA, norfloxacino livre, 6CN-Etil livre, CLN e CLN10NOR+106CN.

O ácido oleico e o ácido esteárico são ácidos graxos com estruturas químicas bastantes semelhantes (figura 9), se diferenciando apenas pela presença de uma ligação dupla C=C na estrutura do ácido oleico, sendo essa insaturação a causa das propriedades desse lipídio. Os espectros obtidos para o ácido oleico (Figura 13) e o ácido esteárico (Figura 14) apresentaram perfis com deslocamentos semelhantes, demonstrando características comuns das duas estruturas químicas, a presença de bandas localizadas em 1.698 cm^{-1} são relacionadas ao estiramento da ligação C=O característico dos ácidos graxos, os deslocamentos próximos a 3.000 cm^{-1} são relacionados aos estiramentos C-H e em 1.462 cm^{-1} flexão de CH_2 , no entanto o espectro não foi capaz de distinguir as duas moléculas, sendo necessário a adição de outras técnicas para distinguir as diferenças sutis entre os picos (Yi *et al.*, 2019).

Figura 13: Espectro de Infravermelho ácido oleico

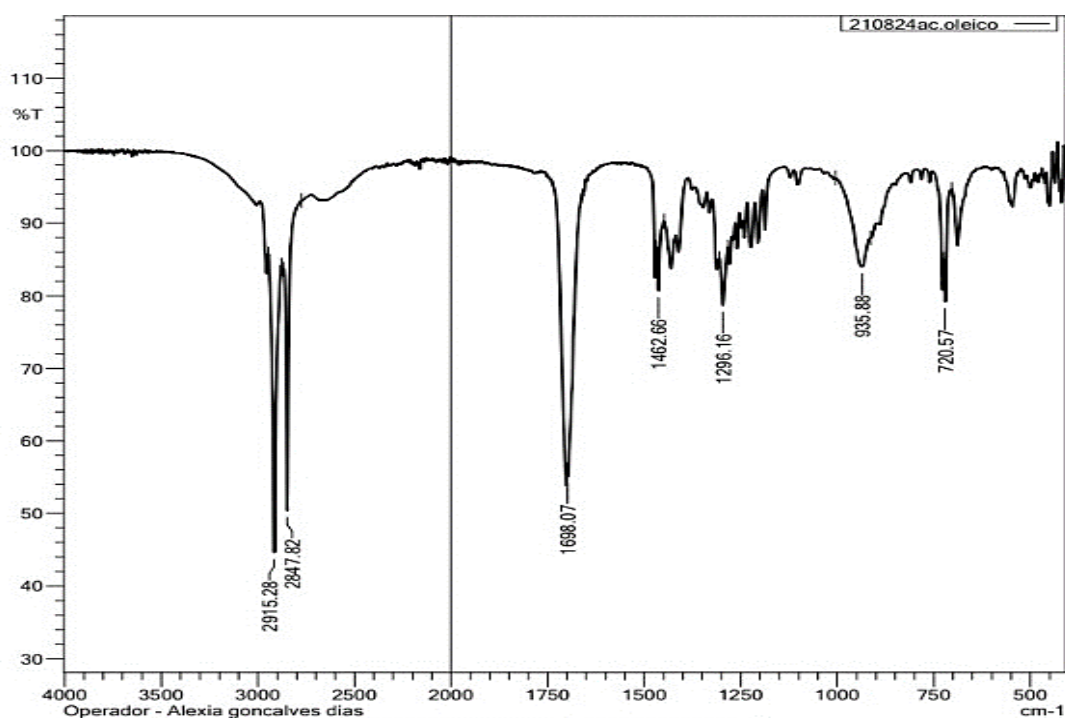
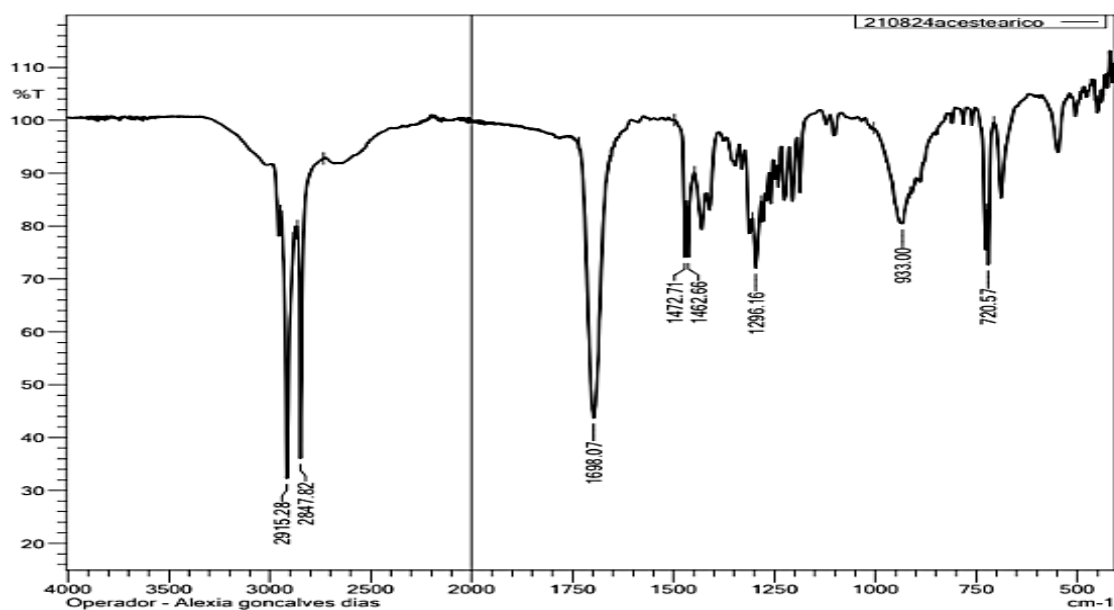
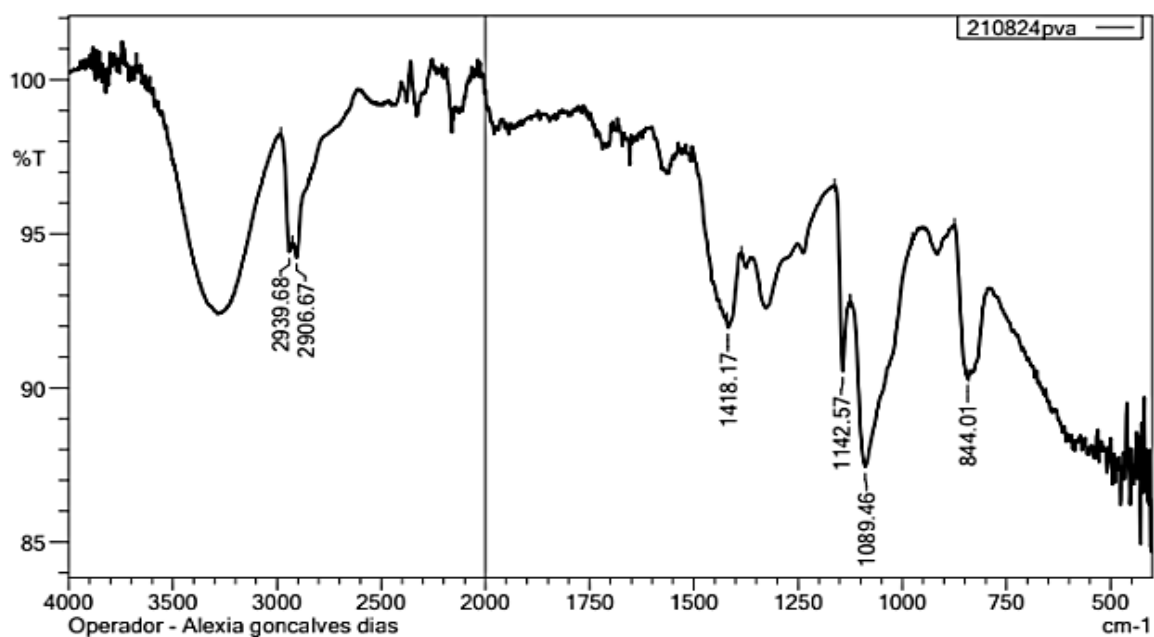


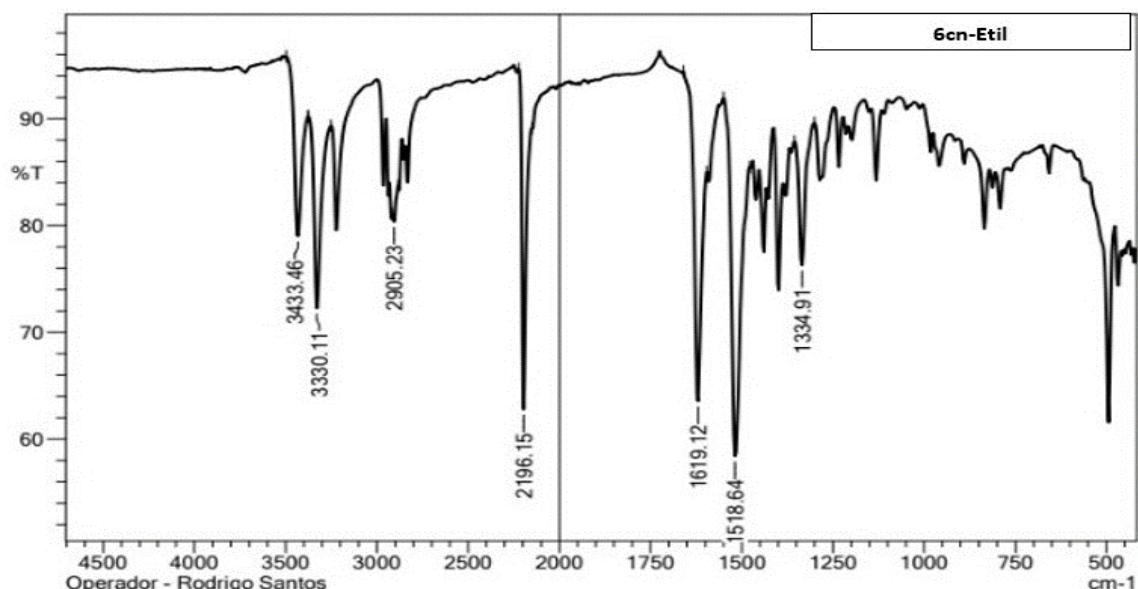
Figura 14: Espectro de infravermelho ácido esteárico

Na figura 15 está disposto o espectro do PVA no qual apresenta picos característicos que confirmam a presença dos grupos alifáticos C-H (CH₂ e CH₃) localizados em 2.930 cm⁻¹ e 2.906 cm⁻¹, o deslocamento observado em 1.142 cm⁻¹, correspondendo ao estiramento da ligação éter (C-O-C) que é uma característica fundamental da estrutura do PVA (Mansur *et al.*, 2008).

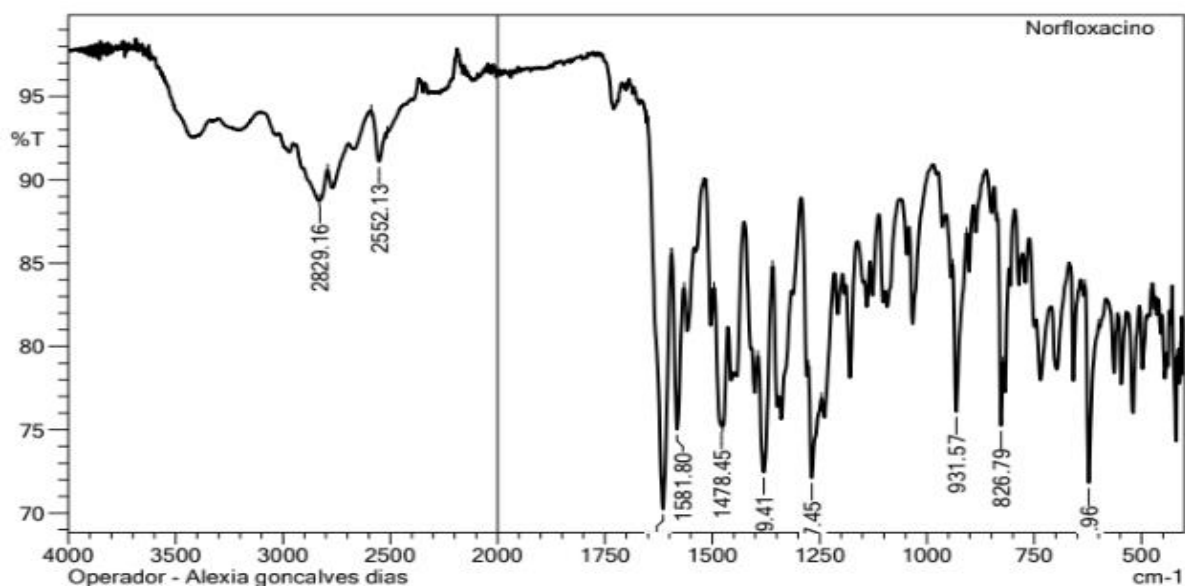
Figura 15: Espectro de Infravermelho PVA

A estrutura do composto 6CN-Etil foi comprovada por espectroscopia de infravermelho (figura 16), foi possível observar deslocamentos característicos da molécula, com bandas de absorção aguda média em 2.196 cm^{-1} referente ao estiramento da nitrila (-CN), também dois deslocamentos em 1.518 e 1.619 cm^{-1} característicos C=C de aromático, estiramentos NH_2 com duas bandas em 3.330 e 3.433 cm^{-1} , além do estiramento CH_2 em 2.905 cm^{-1} .

Figura 16: Espectro de Infravermelho 6CN-Etil



Já o espectro do norfloxacino (figura 17) apresentou estiramentos característicos de amina (N-H) em 2.552 cm^{-1} , além do grupo carbonílico específico das quinolonas em 1581 cm^{-1} , vibrações fora do plano C-H aromáticas presentes no anel quinolínico em 941 cm^{-1} e 931 cm^{-1} confirmando as características estruturais do composto (Liang *et al.*, 2024).

Figura 17: Espectro de infravermelho Norfloxacin

Por fim, os espectros dos CLN e dos CLN10NOR+106CN apresentaram semelhanças, o carreador sem fármaco apresentou picos característicos dos lipídios e do PVA com ausência dos deslocamentos do 6CN-etil e norfloxacin, já o CLN10NOR+106CN apresentou uma certa ambiguidade, pois os deslocamentos em 1.027 cm⁻¹ pode ser atribuído ao estiramento de grupos C-O, mas também pode ter contribuição do norfloxacin ou do 6CN-Etil, contudo, o espectro apresenta variações na intensidade dos picos, sem, entretanto, evidenciar de maneira direta as moléculas.

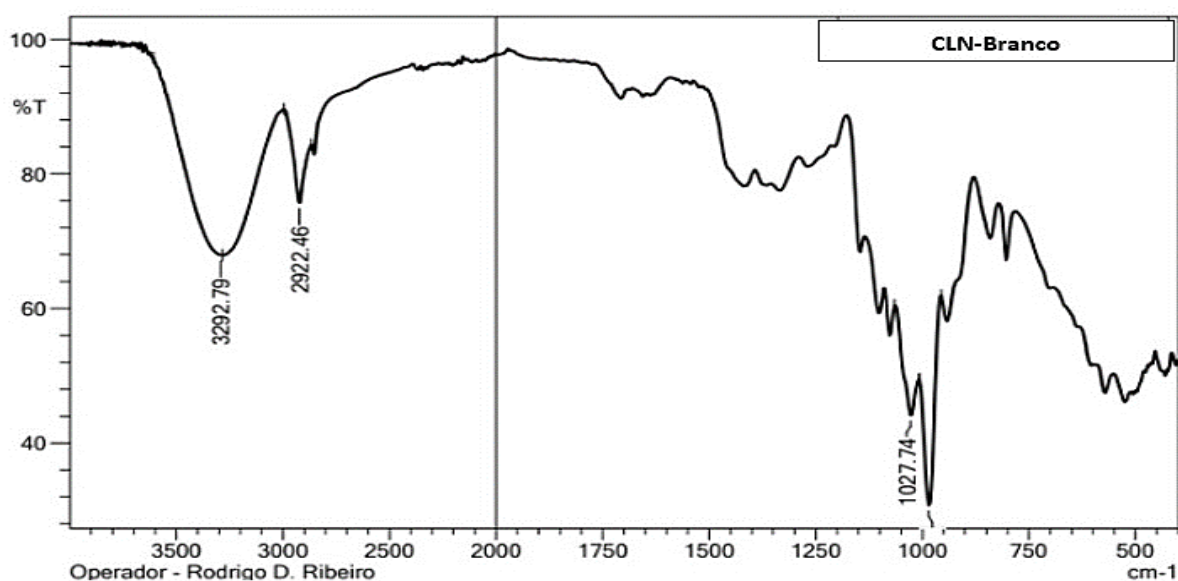
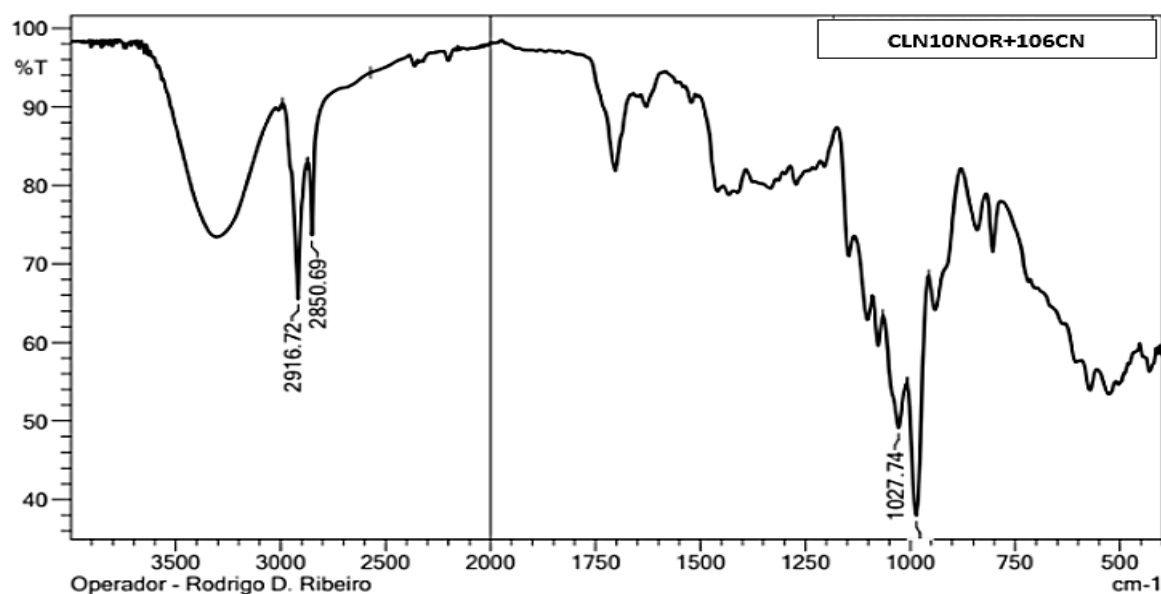
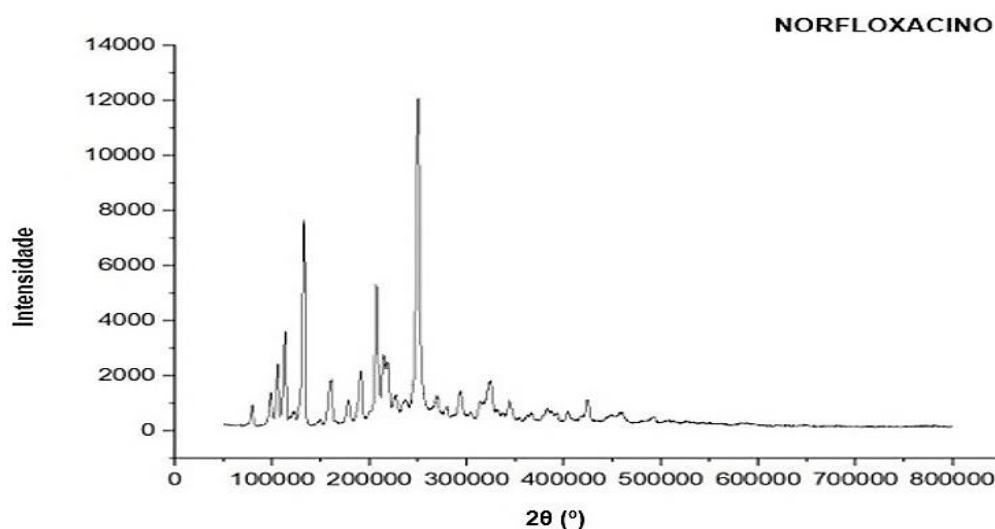
Figura 18: Espectro de infravermelho CLN

Figura 19: Espectro de infravermelho CLN10NOR+106CN

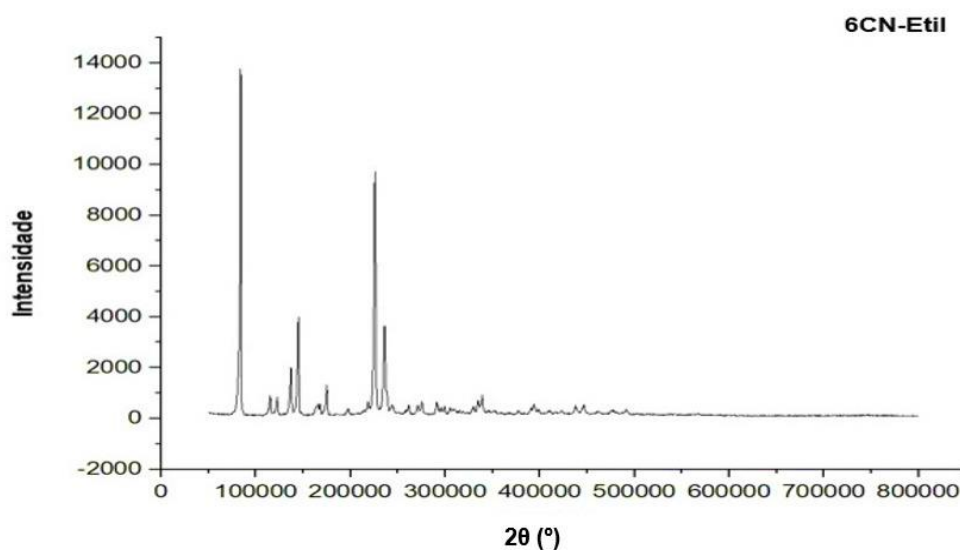
Esses resultados sugerem que as moléculas estão efetivamente encapsuladas e interagindo diretamente com a matriz lipídica, o que pode levar ao mascaramento de seus deslocamentos característicos (Souza, 2022). Por isso, podem ser empregadas técnicas complementares para melhor identificação.

5.4.3 Difração de raios X (DRX)

A técnica de DRX mede a interação entre a difração de raios X com redes em estado amorfo ou cristalino de determinada amostra cobrindo uma grande área faixa angular, utilizado para determinar grau de cristalinidade e identificar estruturas cristalinas (Idris *et al.*, 2019). As análises de DRX foram realizadas para avaliar o grau de cristalinidade as moléculas livres (6CN-Etil e norfloxacino) e do CLN e dos CLN10NOR+106CN.

Figura 16: Difratoograma norfloxacino

Fonte: Autor,2024

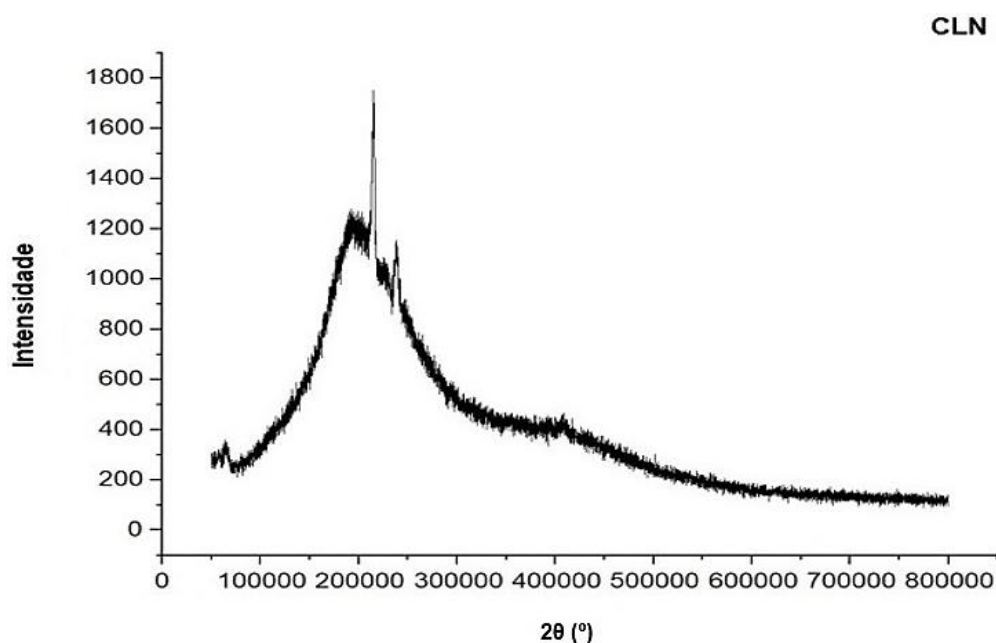
Figura 17: Difratoograma 6CN-Etil

Fonte: Autor,2024

O difratoograma do 6CN-Etil (Figura 21) exibiu picos intensos em ângulos 2θ que são característicos de uma estrutura cristalina, o norfloxacino (figura 20) em seu difratoograma demonstrou diversos picos bem definidos o que indica também uma estrutura cristalina, no entanto, em comparação ao 6CN-Etil provavelmente exibe uma estrutura cristalina mais complexas e possivelmente mais pura, evidenciada pelo maior número de picos (Liang *et al.*, 2024).

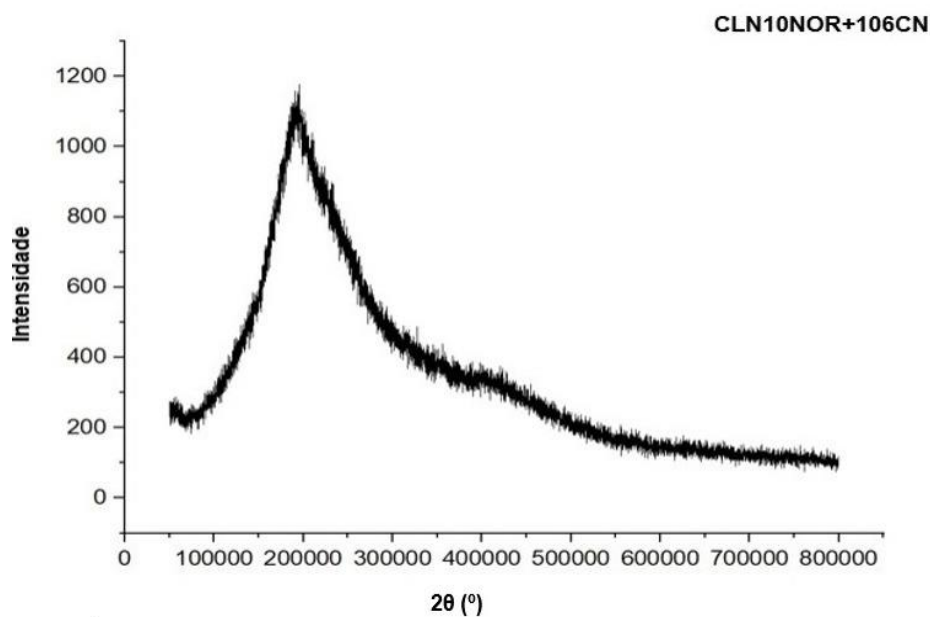
Esse resultado corrobora com dados já reportados na literatura, como no estudo de Thangadurai *et al.*, 2003, que analisou várias fluoroquinolonas e o DRX do norfloxacino apresentou picos intensos e incluindo picos que distintivos e permitem diferenciar o norfloxacino de outras fluoroquinolonas, juntamente com espaçamentos interplanares que são essenciais para determinar a cristalinidade do composto.

Figura 18: Difratoograma CLN



Fonte: Autor, 2024

Figura 19: Difratoograma CLN10NOR+106CN



Fonte: Autor, 2024

Os difratogramas do CLN (figura 22) e do CLN10NOR+106CN (figura 23), por sua vez, mostram o desaparecimento dos picos bem definidos observados anteriormente nas moléculas livres, esse comportamento é substituído por um halo largo amorfo, característico de materiais desordenados, indicando a obtenção dos carreadores lipídicos nanoestruturados, esse padrão amorfo é atribuído à presença de lipídios líquidos na formulação, que interrompem a organização cristalina das moléculas e promovem a dispersão do fármaco em uma matriz lipídica desorganizada no caso dos carreadores contendo as moléculas, além de minimizar a expulsão do ativo ao longo do armazenamento, aumentando seu tempo de prateleira (Idris et al., 2023).

5.5 Estudo de estabilidade dos carreadores lipídicos nanoestruturados

Os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN e CLN10NOR+106CN) foram avaliados quanto ao diâmetro das partículas, índice de polidispersão e potencial zeta, antes e após a liofilização com a adição de 2,5% de trealose como crioprotetor ao decorrer de 90 dias armazenados em refrigerador na temperatura de 4 °C.

Nas condições avaliadas, o diâmetro médio das partículas dos CLN em suspensão (antes da liofilização), apresentaram crescimento desordenado ao longo dos 90 dias, indicando agregação das partículas e instabilidade física, a suspensão também apresentou precipitados, o índice de polidispersão mostrou um aumento abrupto no dia 60, atingindo o valor de 0,9, o que demonstra a heterogeneidade do sistema, já o potencial zeta apresentou uma variação de -29 mV para -23 mV.

Ao comparar com os carreadores submetidos à liofilização com adição de trealose, observou-se uma melhor manutenção do tamanho das partículas, com valores de 196 nm no dia 1 e 232 nm no dia 90, o índice de polidispersão também apresentou maior estabilidade, variando entre 0,08 e 0,3 ao longo do período avaliado, em relação ao potencial zeta apesar de apresentar flutuações moderadas nos valores, essa formulação manteve a carga superficial negativa moderada contribuindo para a estabilidade eletrostática. Esses resultados demonstram a importância da liofilização de carreadores lipídicos nanoestruturados para garantir a estabilidade ao longo prazo além de proteger os carreadores de contaminação bacteriana e manter as propriedades do sistema, além de evitar a degradação (Matarazzo *et al.*, 2024) (Tabela 16).

Em um estudo realizado por Latifah *et al* (2024), que avaliou o efeito do uso de ácido esteárico e ácido oleico no desenvolvimento de carreadores lipídicos nanoestruturados para o carreamento de diclofenaco, observou-se que a proporção de 60:40 resultou em menores diâmetro de partículas, assim como em nosso estudo, esse achado indica que o aumento da concentração de ácido oleico está correlacionado com a redução do tamanho das partículas e o aumento da eficiência de encapsulação. De maneira semelhante, Hu *et al* (2005) relataram que o aumento da concentração do lipídio líquido ácido oleico contribuiu para a redução do diâmetro das partículas, o aumento da eficiência de encapsulação e a obtenção de um potencial zeta estável. Esses achados reforçam que os nossos resultados demonstraram que a formulação contendo essa mesma proporção manteve-se estável ao longo de 90 dias após a liofilização, evidenciando a eficácia dessa composição na manutenção das características físico-químicas dos carreadores lipídicos nanoestruturados.

Tabela 16: Estudo de estabilidade 90 dias carreadores lipídicos nanoestruturados sem fármaco

Amostra não liofilizada	Dia 1	Dia 7	Dia 14	Dia30	Dia 60	Dia 90
Diâmetro das partículas	177,63 (±3,43)	368,63 (±7,45)	400,96** (±14,28)	401,66** (±41,36)	824 **** (±21,92)	523,63 **** (±48,73)
Índice de Polidispersão	0,254 (±0,06)	0,111 (±0,12)	0,383 (±0,05)	0,335 (±0,16)	0,964 **** (±0,05)	0,499 (±0,07)
Potencial Zeta	-29,22 **** (±2,01)	-28,42 **** (±0,63)	-27,32 (±0,60)	-26,55 (±1,36)	-26,07 (±1,56)	-24,89 (±0,84)
Amostra liofilizada	Dia 1	Dia 7	Dia 14	Dia 30	Dia 60	Dia 90
Diâmetro das partículas	196,36 (±1,87)	181,8 (±5,23)	180,06** (±10,42)	201,23** (±9,17)	235,26 **** (±8,13)	232,3**** (±3,21)
Índice de Polidispersão	0,0840 (±0,06)	0,113 (±0,08)	0,094 (±0,10)	0,140 (±0,09)	0,177 **** (±0,08)	0,271 (±0,09)
Potencial Zeta	-17,52 **** (±1,70)	-23,23 **** (±0,57)	-25,03 (±0,97)	-24,93 (±1,79)	-28,42 (±1,57)	-25,11 (±0,47)

Fonte: Autor, 2024

*P < 0,05; ** P < 0,01; **** P < 0,0001

Os carreadores lipídicos nanoestruturados contendo norfloxacin e 6CN-Etil ao decorrer dos 90 dias (tabela 17) mantiveram o diâmetro das partículas com pequenas

variações antes e após a liofilização, além disso o índice de polidispersão durante os três meses não apresentam grandes variações e foram menores que 0,3 indicando boa homogeneidade do sistema, no entanto apesar dos resultados terem sido satisfatórios os CLN10NOR+106CN em suspensão apresentaram precipitados das moléculas ao longo dos dias avaliados reforçando ainda mais na importância da liofilização como estratégia para melhorar a estabilidade da formulação. O sistema liofilizado apresentou valores aceitáveis de tamanho médio e PDI ao longo dos 60 dias de estudo de estabilidade.

Tabela 17: Estudo de estabilidade 90 dias carreadores lipídicos nanoestruturados contendo norfloxacino e 6CN-Etil

Amostra não liofilizada	Dia 1	Dia 7	Dia 14	Dia30	Dia 60	Dia 90
Diâmetro das partículas	244,33 (±6,80)	299,16 (±74,57)	277,13 (±85,50)	373,33* (±192,38)	336,76 (±160,05)	203,73 (±2,34)
Índice de Polidispersão	0,128 (±0,01)	0,254 (±0,18)	0,152 (±0,13)	0,266 (±0,27)	0,329 ***** (±0,09)	0,136* (±0,09)
Potencial Zeta	-32,53 ***** (±0,67)	-28,84 ***** (±4,80)	-31,05 (±2,25)	-21,11 ***** (±3,79)	-26,44 (±1,61)	-27,65 (±2,59)
Amostra liofilizada	Dia 1	Dia 7	Dia 14	Dia 30	Dia 60	Dia 90
Diâmetro das partículas	244,43 (±7,44)	250,4 (±7,64)	221,16 (±1,74)	215,96* (±4,57)	241,93 (±4,65)	349,23 (±125,15)
Índice de Polidispersão	0,319 (±0,00)	0,3108 (±0,27)	0,261 (±0,04)	0,141 (±0,11)	0,278 ***** (±0,05)	0,381* (±0,11)
Potencial Zeta	-34,09 ***** (±0,84)	-32,96 ***** (±0,91)	-33,26 (±0,85)	-31,79 ***** (±2,06)	-23,88 (±2,56)	-23,88 (±1,45)

Fonte: Autor, 2024

*P < 0,05; ***** P < 0,0001

Utilizando a análise estatística ANOVA bidirecional, seguida pelo teste de Tukey a estabilidade dos carreadores lipídicos nanoestruturados foram avaliados considerando o diâmetro médio das partículas, PDI e potencial zeta, das formulações CLNs e FDCLNs (carreador liofilizado sem fármacos), CLN10NOR+106CN e FDCLNNOR+6CN (carreador liofilizado com ambos os fármacos). Em relação ao diâmetro das partículas houveram diferenças significativas entre os grupos CLNs e FDCLNs de P > 0,01 no dia 14 e 30, já no para os CLN10NOR+106CN e FDCLNNOR+6CN no dia 30 a diferença foi significativa entre o par de P < 0,05, nos dias 60 e 90 houveram diferenças altamente significativas de P < 0,0001 entre CLNs e FDCLNs. Já a análise do PDI somente

houveram diferenças significativas ($P < 0,0001$) no dia 60 nos dois pares analisados, já no dia 90 houve diferença significativa entre CLN10NOR+106CN e FDCLNNOR+6CN ($P < 0,05$). Por fim, na análise do potencial zeta, os dois pares analisados apresentaram diferenças altamente significativas no dia 1 e 7 ($P < 0,0001$) e no dia 30 nos grupos CLN10NOR+106CN vs. FDCLNNOR+6CN.

Os resultados indicam que não houveram diferenças significativas no tamanho das partículas e no PDI nos carreadores ao decorrer dos primeiros dias de armazenamento contendo 6CN-Etil e Norfloxacino após a liofilização, evidenciando que o processo com adição de trealose contribuiu para a estabilidade desses parâmetros (Arya *et al.*, 2022). Em relação ao potencial zeta, os resultados mostram que as variações iniciais foram gradualmente se estabilizando com o passar dos dias, esse padrão de variação seguido pela estabilização mostra que os carreadores alcançaram um estado de equilíbrio, o que é um fator interessante para o aumento do tempo de prateleira, pois mostra uma maior estabilidade ao longo do tempo de armazenamento (Pochapski *et al.*, 2021).

5.6 Validação do método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

5.6.1 Desenvolvimento e otimização do método analítico

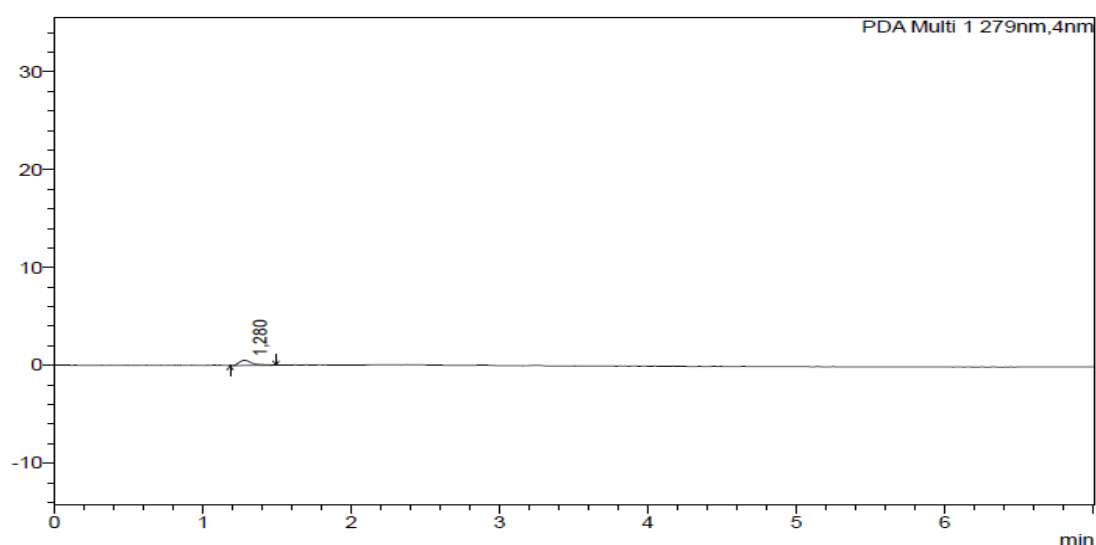
O método foi desenvolvido e otimizado para a quantificação simultânea do norfloxacino e do 6CN-Etil. Foram realizadas diversas combinações composição e fluxo da fase móvel e do sistema de detecção, foram testadas diferentes proporções da fase móvel, ajustando a mistura de água acidificada e acetonitrila em modo isocrático. O objetivo foi otimizar parâmetros como composição da fase móvel, tempo de retenção, fluxo, assegurando maior precisão e eficiência na quantificação dos compostos. A proporção ideal da fase móvel foi determinada como 60:40 (acetonitrila:água), com tempos de retenção de 1,450 minutos para o norfloxacino e 5,878 minutos para o 6CN-Etil, com uma análise total de 7 minutos e a temperatura da coluna foi fixada em 40 °C.

5.6.2 Seletividade

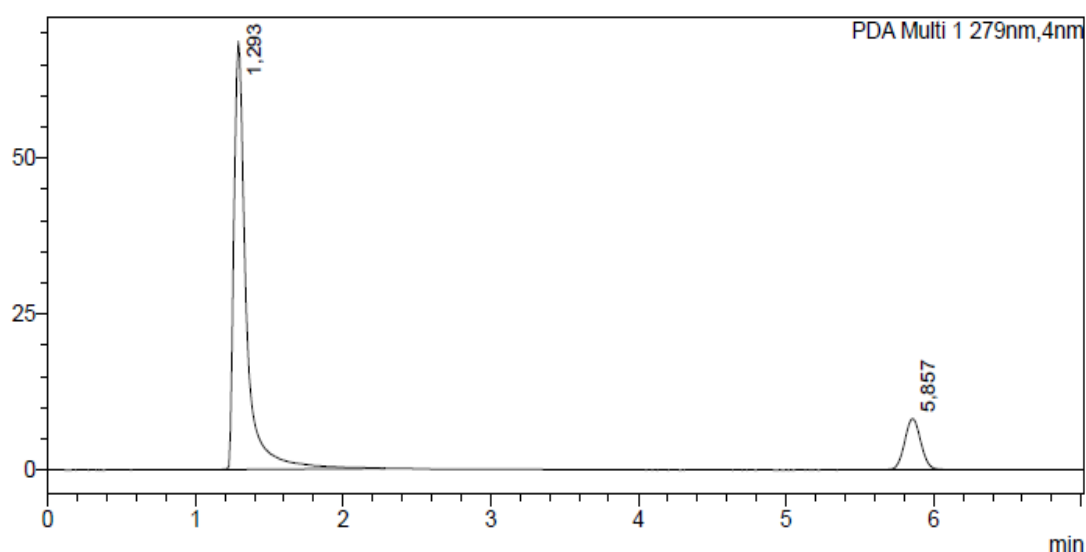
A seletividade de um método analítico é referente a capacidade de medir com precisão um determinado composto, mesmo na presença de impurezas, produtos de degradação ou componentes da matriz, ela assegura que o pico no tempo de retenção característico do analito seja gerado exclusivamente por ele, sem interferência de outros

compostos presentes na amostra (Subramaniam *et al.*, 2022). Para a avaliação da seletividade foi coletado o sobrenadante dos carreadores lipídicos nanoestruturados sem fármaco (CLN) após a centrifugação e diluído em 100% de acetonitrila, no qual após a leitura no CLAE não foi observado nenhum sinal nos comprimentos de onda (λ) de 221 nm (6CN-Etil) e 279 nm (Norfloxacin), esse resultado confirma que os componentes presentes nos carreadores lipídicos nanoestruturados não interferem na detecção dos fármacos de interesse (Figura 24).

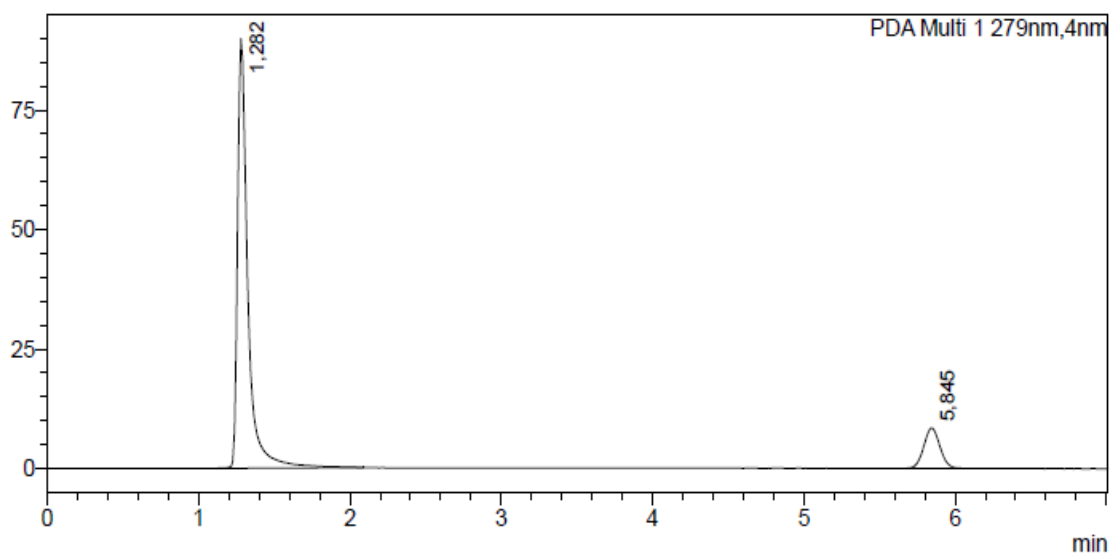
Figura 24: Sobrenadante dos CLN



Posteriormente foi adicionado 10 $\mu\text{g/mL}$ da solução padrão do norfloxacin e 10 $\mu\text{g/mL}$ do 6CN-Etil ao sobrenadante (10 $\mu\text{g/mL}$) dos CLN e diluídos em 100% de acetonitrila os valores de tempo de retenção para os dois fármacos foram semelhantes aos tempos previamente estabelecidos, o norfloxacin teve seu tempo de retenção de 1,293 minutos e o 6CN-Etil de 5,857 minutos, fator caudal de 1,963 e 1,052 para o 6CN-etil e norfloxacin, respectivamente, e pratos teóricos de 1111 para o 6CN-Etil e 11801 para o norfloxacin, confirmando a seletividade do método (Figura 25).

Figura 25: CLN sem fármaco com adição das soluções padrão do norfloxacinó e 6CN-Etil

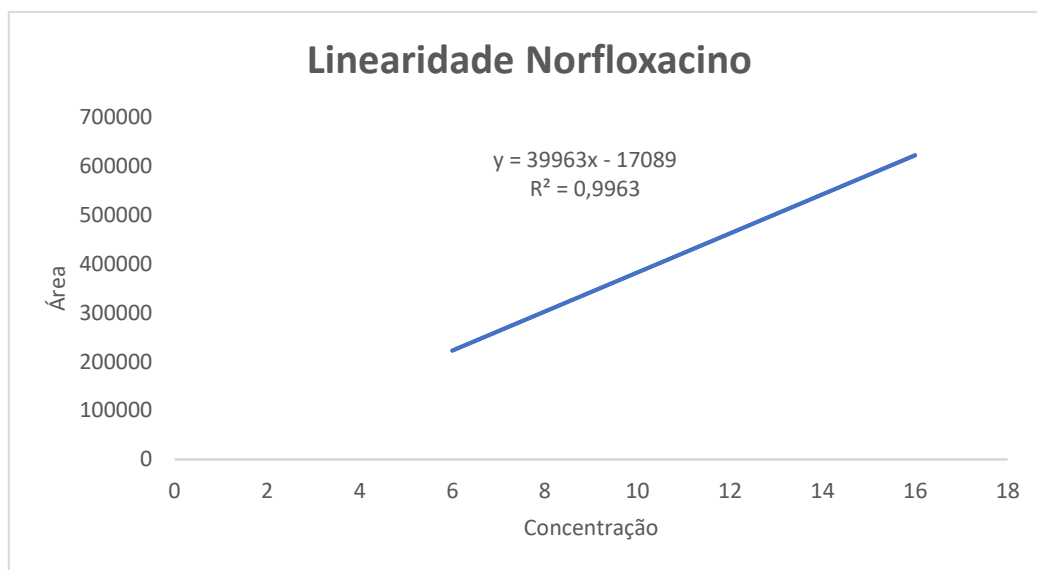
Por isso o método desenvolvido para a quantificação simultânea do norfloxacinó e 6CN-Etil se mostrou seletivo atendendo os critérios exigidos pelo IHC, detectando as moléculas mesmo na presença dos componentes presentes no CLN sem nenhuma interferência e garantindo a identificação nos tempos de retenção pré-estabelecidos. Na figura 14 pode ser observado um cromatograma com os picos nos comprimentos de onda relacionados as soluções padrões do norfloxacinó e 6CN-Etil e seus respectivos tempos de retenção sem a adição do CLN, diluídos em 100% de acetonitrila sem a adição do CLN, diluídos em 100% de acetonitrila (Figura 26).

Figura 26: Cromatograma norfloxacinó e 6CN-Etil

5.6.3 Linearidade

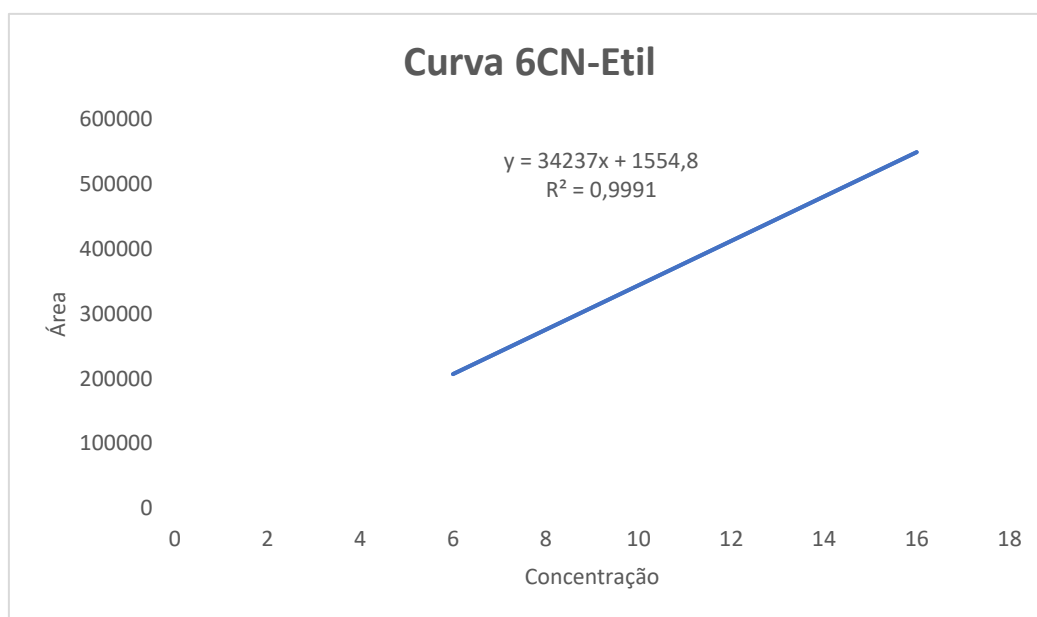
A linearidade do método foi analisada para a quantificação do 6CN-Etil e norfloxacinó por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de acordo com as diretrizes do ICH Q2(R1), a representação gráfica da curva de calibração e coeficiente de regressão foram construídos (Figura 27 e Figura 28) por seis níveis de concentração variando de 6 µg/mL a 16 µg/mL. O desvio padrão relativo (DPR%) foi calculado.

Figura 27: Linearidade norfloxacinó



Fonte: Autor, 2024

Figura 28: Linearidade 6CN-Etil



Fonte: Autor, 2024

A linearidade se trata da capacidade do método em produzir resultados diretamente proporcionais à concentração da substância analisada, dentro de uma faixa específica de aplicação. A equação da linha de regressão para o norfloxacinó foi estabelecida como $y=40614x-19506y$, enquanto para o 6CN-Etil foi $y=34093x+4528,8y$, de acordo com o ICH esses resultados mostram uma correlação forte entre a concentração e a área, com o coeficiente de determinação (R^2) próximo de 0,9999 revela que 99,99% da variação nas áreas observadas pode ser atribuída à concentração, confirmando uma relação linear altamente robusta entre a concentração e a resposta para o antibiótico e o 6CN-Etil. O erro padrão é relacionado as médias dos desvios das observações em relação a linha de regressão, quando esse desvio é pequeno em relação as áreas observadas, indica que os dados estão ligados fortemente a linha de regressão (Tabela 18 e 19).

Tabela 18: Coeficientes de regressão linear do norfloxacinó

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,999233
R^2	0,998466
R^2 ajustado	0,998083
Erro padrão	6658,892
Observações	6

Tabela 19: Coeficientes de regressão linear do 6CN-etil

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,99951
R-Quadrado	0,999019
R-quadrado ajustado	0,998774
Erro padrão	4468,217
Observações	6

As tabelas 20 e 21 apresentam a relação entre o DPR% das áreas dos cromatogramas e suas respectivas concentrações ($\mu\text{g/mL}$) o DPR% é calculado com base nas áreas do cromatograma, e de acordo com o ICH os valores devem ser inferiores a 2%, o que indica

precisão nas diluições. No norfloxacin e no 6CN-etil, o DPR foi inferior a 2%, reforçando a confiabilidade das medições e a precisão do método analítico utilizado.

Tabela 20: DPR% das concentrações da linearidade norfloxacin

Linearidade: Norfloxacin				
Concentrações (µg/mL)	Média da área	Desvio padrão	DPR%	Concentração real (µg/mL)
6	227835,6667	1225,02	0,53768	6,09006
8	305742,6667	2646,71	0,86567	8,00829
10	387295	3560,87	0,91942	10,0163
12	456392	446,68	0,09787	11,7176
14	550427,3333	1103,16	0,20042	14,0329
16	635803	2385,6	0,37521	16,1351

Fonte: Autor, 2024

Tabela 21: DPR% das concentrações da linearidade 6CN-Etil

Linearidade: 6CN-Etil				
Concentrações (µg/mL)	Média da área	Desvio padrão	DPR%	Concentração real (µg/mL)
6	211647	1717,75	0,81161	6,07509
8	278885	4179,4	1,49861	8,04728
10	340265	2679,74	0,78754	9,84767
12	409307	488,258	0,11929	11,8728
14	486809	2538,81	0,52152	14,146
16	550383	538,21	0,09779	16,0107

Fonte: Autor, 2024

Foram analisados os coeficientes do modelo de regressão linear para o norfloxacin e 6CN-Etil e apresentaram respectivamente os valores de intercepto -19505,9 (não significativo, $P = 0,1004$) (tabela 22) e 4528,764 (não significativo, $P = 0,5024$) (tabela 23). Toda via os valores da inclinação (coeficientes angulares) foram altamente significativos tanto para o norfloxacin ($P = 8,83^{-07}$) e para o 6CN-Etil ($P = 3,61^{-07}$), como esperado, esses resultados mostram uma correlação entre a concentração das moléculas e resposta obtida (área do cromatograma), comprovando que o modelo de regressão linear é apropriado para representar essa relação de maneira consistente. Os resultados estão apresentados nas tabelas 22 e 23.

Tabela 22: Análise estatística dos coeficientes do modelo de regressão linear-IC-95% do norfloxacin

Parâmetros	Coeficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P	Inferiores 95%	Superiores 95%	Inferior 95,0%
------------	--------------	-------------	--------	---------	----------------	----------------	----------------

Interseção	-19505,9	9167,14	-2,12781	0,100455	-44958	5946,133	-44958
Variável X	40614,11	795,8898	51,02981	8,83 ⁻⁰⁷	38404,37	42823,85	38404,37

Fonte: Autor, 2024.

Tabela 23: Análise estatística dos coeficientes do modelo de regressão Linear-IC-95% do 6CN-Etil

Parâmetros	Coeficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P	Inferiores 95%	Superiores 95%	Inferior 95,0%
Interseção	4528,764	6151,289	0,736230	0,502434	-12550	21607,48	-12550
Variável X	34092,77	534,0541	63,83767	3,61 ⁻⁰⁷	32610	35575,54	32610

Fonte: Autor, 2024.

Somado a isso, também foi realizada a análise de variância (ANOVA) afim de avaliar a significância estatística das curvas de calibração do norfloxacino e 6CN-Etil (Tabelas 24 e 25). A análise ANOVA demonstrou que as duas curvas de calibração são estatisticamente significativas, sendo para o norfloxacino a estatística F de 2604,042 com um valor de $P = 8,83^{-07}$ e para o 6CN-Etil a estatística F de 4075,249 e valor de $P = 3,61^{-07}$. Esses resultados confirmam a alta significância do modelo, demonstrando a linearidade do método e sua eficácia na quantificação simultânea de norfloxacino e 6CN-etil por CLAE.

Tabela 24: Teste F-ANOVA do norfloxacino

ANOVA	(Teste F- ANOVA)- Significância da curva de calibração				
	Gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	1,15 ⁺¹¹	1,15 ⁺¹¹	2604,042	8,83 ⁻⁰⁷
Resíduo	4	1,77 ⁺⁰⁸	44340841		
Total	5	1,16 ⁺¹¹			

Fonte: Autor, 2024.

Tabela 25: Teste F-ANOVA do 6CN-Etil

ANOVA	(Teste F- ANOVA)- Significância da curva de calibração				
	Gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	8,14 ⁺¹⁰	81362194458	4075,249	3,61 ⁻⁰⁷
Resíduo	4	79859855	19964963,87		
Total	5	8,14 ⁺¹⁰			

Fonte: Autor, 2024.

Em relação aos resíduos do norfloxacino (Tabela 26 e Figura 29), observa-se uma variação de -11.471,4 a 335,71, enquanto para o 6CN-Etil (Tabela 28 e Figura 30), a variação é de -5.191,23 a 4.981,69. Essas amplitudes de variação, comparadas aos valores previstos, são relativamente baixas, além disso, os resíduos estão distribuídos de maneira

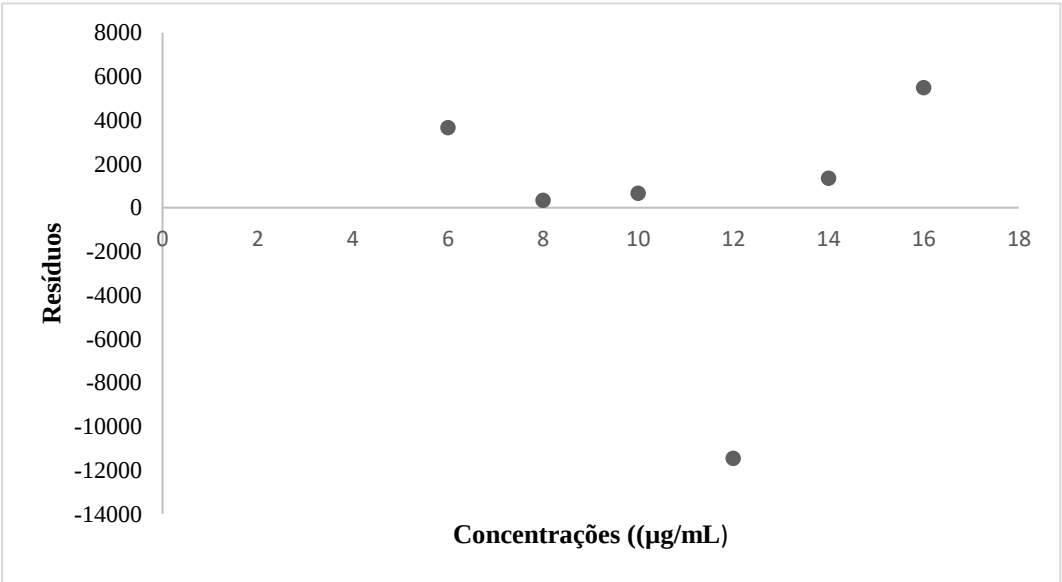
aleatória em torno de zero em ambas as análises, indicando que o modelo linear foi bem ajustado, o que sugere a presença de homocedasticidade.

Tabela 26: Análise de resíduos e resíduos padronizados do norfloxacino

Observação	Y previsto	Resíduos	Resíduos padrão
1	224178,7	3656,937	0,614003
2	305406,9	335,7175	0,056367
3	386635,2	659,8317	0,110786
4	467863,4	-11471,4	-1,92606
5	549091,6	1335,727	0,22427
6	630319,8	5483,175	0,92063

Fonte: Autor, 2024.

Figura 29: Análise da distribuição normal dos resíduos para a concentração resposta do norfloxacino



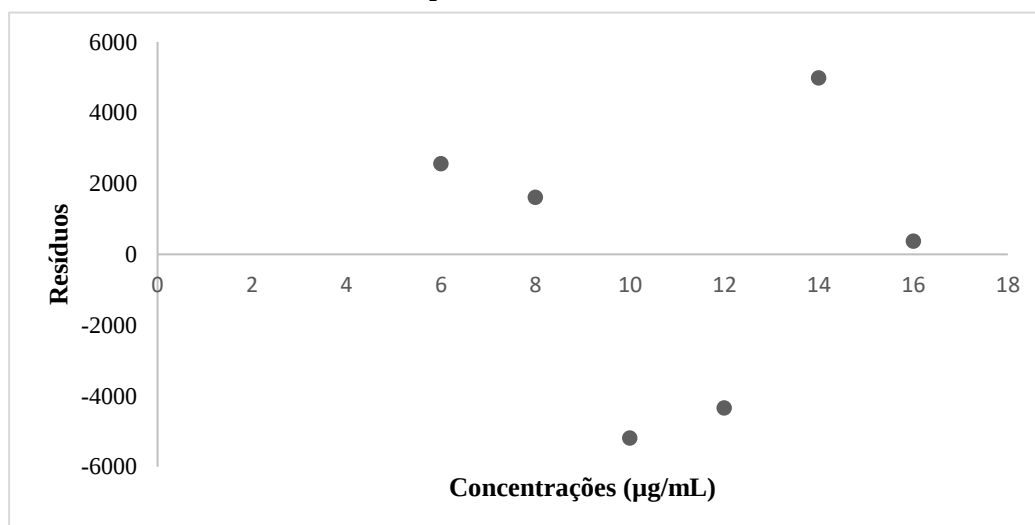
Fonte: Autor, 2024.

Tabela 27: Análise de resíduos e resíduos padronizados do 6CN-Etil

Observação	Y previsto	Resíduos	Resíduos padrão
1	209085,4	2561,357	0,640900899
2	277270,9	1613,814	0,403807423
3	345456,5	-5191,23	-1,298945392
4	413642	-4335,02	-1,084705871
5	481827,6	4981,686	1,246513733
6	550013,1	369,3929	0,092429209

Fonte: Autor, 2024.

Figura 30: Análise da distribuição normal dos resíduos para a concentração resposta do 6CN-Etil



Fonte: Autor, 2024.

Diante do exposto, os resultados indicam que o método de regressão para o norfloxacino e 6CN-Etil apresentam linearidade ambos com R^2 próximos a 0,999 dentro das faixas de concentração de 6 à 16 µg/mL, conforme a literatura valores de R^2 mais próximos a 1,0 indicam menor dispersão dos conjuntos de pontos e a incerteza dos coeficientes de regressão também são reduzidos, os resultados confirmam a linearidade e adequação do método analítico desenvolvido, validando sua aplicação na quantificação simultânea das moléculas de forma confiável e reprodutível (Silva, 2019; Vitnor; Khandre, 2022).

5.6.4 Limite de detecção e quantificação

Os valores de limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ) foram calculados utilizando o desvio padrão do intercepto e a inclinação da equação da reta, os valores de LOD e LOQ para o 6CN-Etil foram 0,386 µg/mL e 1,172 µg/mL, já para o norfloxacino LOD e LOQ apresentaram valores de 0,483 µg/mL e 1,466 µg/mL, respectivamente. Valores baixos de LOD e LOQ indicam que o método analítico é capaz de detectar e quantificar pequenas concentrações do analito de forma precisa e confiável (Guiard; Gotti, 2024).

5.6.5 Precisão

A precisão foi realizada para avaliar a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser

validado de acordo com o ICH. Para repetibilidade (Intra-dia) do norfloxacino (tabela 28) e o 6CN-Etil (tabela 29) foram escolhidos três níveis ponto baixo (8 µg/mL), médio (10 µg/mL) e alto (14 µg/mL), o estudo foi realizado em triplicada preparadas em soluções mãe independentes. De acordo com as tabelas a seguir (Tabelas 28 e 29) podemos observar que o DPR% tanto para o norfloxacino quanto para o 6CN-etil foram abaixo de 2%.

Tabela 28: Repetibilidade (intra-dia): norfloxacino

Repetibilidade Norfloxacino				
Concentrações (µg/mL)	Média da área	Desvio padrão	DPR%	Concentração real (µg/mL)
8	310223,6667	5585,005849	1,800315852	8,118620837
10	392743,3333	336,3351503	0,085637393	10,15042432
14	546799	5727,714291	1,047499043	13,94359088

Fonte: Autor, 2024

Tabela 29: Repetibilidade (intra-dia) 6CN-Etil

Repetibilidade 6CN-Etil				
Concentrações (µg/mL)	Média da área	Desvio padrão	DPR%	Concentração real (µg/mL)
8	269778,33	4676,469858	1,733449014	7,780175794
10	332598	469,6253826	0,1411991	9,622773003
14	469216,5	4414,467635	0,940816795	13,63000323

Fonte: Autor, 2024

A precisão intermediária foi realizada por outro analista em dia diferente do realizado a repetibilidade (intra-dia), no qual foram escolhidos os mesmos três níveis ponto baixo (8 µg/mL), médio (10 µg/mL) e alto (14 µg/mL) em triplicata com três soluções mães independentes e as mesmas condições preestabelecidas anteriormente (Tabelas 30 e 31). Diante disso, os resultados da repetibilidade intra-dia e da precisão intermediária sugerem que o método mesmo em dias diferentes e analistas diferentes é altamente preciso tendo em vista que o DPR% foi abaixo de 2% tanto para o norfloxacino e 6CN-Etil de acordo com o órgão regulador ICH (Rocha *et al.*, 2022).

Tabela 30: Precisão intermediária norfloxacino

Precisão intermediária Norfloxacino				
Concentrações (µg/mL)	Média da área	Desvio padrão	DPR%	Concentração real (µg/mL)
8	310067,3333	4085,190979	1,317517371	8,114771589
10	395876,6667	1528,278225	0,386049079	10,22757341
14	522965	2725,189535	0,521103618	13,3567489

Fonte: Autor, 2024

Tabela 31: Precisão intermediária 6CN-Etil

Precisão intermediária 6CN-Etil				
Concentrações (µg/mL)	Média da área	Desvio padrão	DPR%	Concentração real (µg/mL)
8	273841	268,6317182	0,098097698	7,222804944
10	383913,3333	4745,982968	1,236212071	9,933011605
14	576431,5	3905,350752	0,677504743	14,67320382

Fonte: Autor, 2024

5.6.6 Exatidão

A exatidão tem o objetivo de avaliar o grau de concordância entre os resultados individuais obtidos pelo método em estudo e um valor de referência aceito como verdadeiro (Galvão, 2019). A análise da exatidão foi realizada para as concentrações nos níveis 8 µg/mL, 10 µg/mL e 14 µg/mL. Os valores para a exatidão abaixo (Tabelas 32 e 33) foram próximo a 100% na exatidão do norfloxacino e do 6CN-Etil e o DPR% abaixo de 2%, de acordo com as diretrizes do ICH, mostrando que os resultados foram satisfatórios confirmando a exatidão e recuperação do método são adequadas.

Tabela 32: Exatidão norfloxacino

Exatidão Norfloxacino					
Concentrações (µg/mL)	Média da área	Desvio padrão	DPR%	Concentração real (µg/mL)	Exatidão %
8	298959	2255,183585	0,75434544	7,841261634	98,01577042
10	378811	4195,455041	1,107532527	9,807381691	98,07381691
14	537978,3333	2869,550894	0,533395253	13,72640797	98,04577122

Fonte: Autor, 2024

Tabela 33: Exatidão 6CN-Etil

Exatidão 6CN-Etil

Concentrações (µg/mL)	Média da área	Desvio padrão	DPR%	Concentração real (µg/mL)	Exatidão %
8	276328	5204,772714	1,883548795	7,972287566	99,65359
10	340896,3333	2797,97254	0,820769327	9,866175852	98,66176
14	477441	8795,371453	1,842190229	13,87124043	99,08029

Fonte: Autor,2024

5.6.7 Robustez

A robustez de um método analítico se refere a sua capacidade de permanecer inalterado por pequenas variações nos parâmetros do método (Galvão, 2019). As tabelas 35 e 36 apresentam os dados de robustez do norfloxacino e 6CN-Etil respectivamente onde foram analisadas por meio da concentração do nível do ponto médio 10 µg/mL, no qual foram alterados os parâmetros de fluxo da fase móvel, temperatura da coluna e proporção da fase móvel de água acidificada: acetonitrila. As tabelas a seguir mostram dados de parâmetros, como tempo de retenção, área, recuperação (%), concentração real, pratos teóricos e fator de cauda que são de extrema importância para a robustez do método a ser avaliado.

Tabela 34: Robustez norfloxacino

Robustez Norfloxacino						
Parâmetros variados	Tempo Retenção	Área	Concentração real (µg/mL)	Taxa de Recuperação %	Fator caudal	Pratos teóricos
FLUXO 1, 8	1,281	405398	10,46200817	104,6200817	1,789	1721
FLUXO 1,6	1,442	424736	10,93814941	109,3814941	1,863	1763
FLUXO 2,0	1,16	337246	8,78396612	87,8396612	1,748	1621
40C	1,287	389772	10,077264	100,77264	1,88	1695
38C	1,288	386209	9,989535628	99,89535628	1,749	1741
42C	1,283	361110	9,371546757	93,71546757	1,874	1608
60:40 ACN:H2O	1,285	393712	10,17427488	101,7427488	1,869	1795
62:38 acn:h2o	1,282	373230	9,669966022	96,69966022	1,882	1728
58:42ACN:H2O	1,292	378730	9,805387305	98,05387305	1,727	1745

Fonte: Autor, 2024

Tabela 35: Robustez 6CN-Etil

Robustez 6CN-Etil						
Parâmetros variados	Tempo Retenção	Área	Concentração real (µg/mL)	Taxa de	Fator Tailing	Pratos teóricos

				Recuperação %		
FLUXO 1,8	5,886	344733	9,978711172	99,78711172	1,053	11733
FLUXO 1,6	5,905	399464	11,58405538	115,8405538	1,059	12511
FLUXO 2,0	6,61	341235	9,876109465	98,76109465	1,051	10751
40C	5,343	389188	11,28264453	112,8264453	1,057	11534
38C	5,895	351847	10,18737571	101,8737571	1,052	11584
42C	6,047	384370	11,1413252	111,413252	1,057	11436
60:40 ACN:H2O	5,782	371250	10,75649547	107,5649547	1,055	11564
62:38 ACN:H2O	5,913	373602	10,82548324	108,2548324	1,064	10813
58:42ACN:H2O	5,338	364253	10,55126272	105,5126272	1,043	12326

Fonte: Autor, 2024

Os resultados obtidos para a robustez do derivado tiofênico 6CN-etil apresentaram uma taxa de recuperação variando entre 98% e 115%, esses valores, de acordo com as diretrizes do ICH indicam que o método é robusto, o tempo de retenção do 6CN-etil apresentou uma variação mínima de 5,33 minutos e máxima de 6,61 minutos, valores próximos ao tempo de retenção de referência estabelecido para esse composto, reforçando a consistência do método. Para a robustez do norfloxacino, o tempo de retenção variou entre 1,16 minutos e 1,44 minutos, também muito próximo aos valores de referência descritos no estudo, a sua taxa de recuperação foi de 87% a 109%, o que evidencia que o método analítico avaliado é robusto e confiável para a análise desse fármaco.

Os valores do fator de caudal foram próximos a 1 tanto para o norfloxacino quanto para o 6CN-etil indicando uma boa simetria entre os picos, já a avaliação dos pratos teóricos também não apresentou grandes variações. Por isso, essa consistência nos resultados relatadas acima para ambos os compostos demonstra a adequação do método submetido a diferentes variações, garantindo sua aplicabilidade em estudos posteriores.

5.7 Avaliação da atividade de potenciação do carregador lipídico nanoestruturado frente as cepas *S. aureus* 1199B e K2068

5.7.1 Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM)

Geralmente o uso de antibiogramas são suficientes para avaliar a suscetibilidade ou resistência de cepas a determinado antibiótico, onde são identificados os antibióticos e são interrompidos o seu uso e substituído por outro que a cepa não possui resistência, mas em pacientes com infecções crônicas, tratados com uma ampla variedade de antibióticos

e com histórico de terapias que não deram certo, são necessários estudos mais precisos para a identificação do antibiótico eficaz. Dentre esses, a concentração inibitória mínima (CIM), já é um parâmetro estudado a muitos anos, que vem aparecendo cada vez mais atualmente em exames de rotina, a CIM é a menor concentração de um agente antibacteriano expresso em $\mu\text{g/mL}$ que sob condições controladas impede totalmente o crescimento da cepa testada (Krochmal; Wicher, 2021).

Mecanismos de resistências a antimicrobianos como a superexpressão de bombas de efluxo, contribuem para o aumento da CIM, dependendo da cepa e do antibiótico entre 2x e 8x, podendo afetar drasticamente o uso clínico dos antibióticos, ou até mesmo torná-lo ineficaz, principalmente frente as cepas multirresistentes. Portanto, a inibição das bombas de efluxo, pode reestabelecer a CIM dos antibióticos a valores equivalentes aos das cepas não resistentes, tornando as cepas bacterianas suscetíveis ao tratamento, e prolongado a aplicabilidade do uso dos antibióticos disponíveis (Zhang *et al.*, 2024).

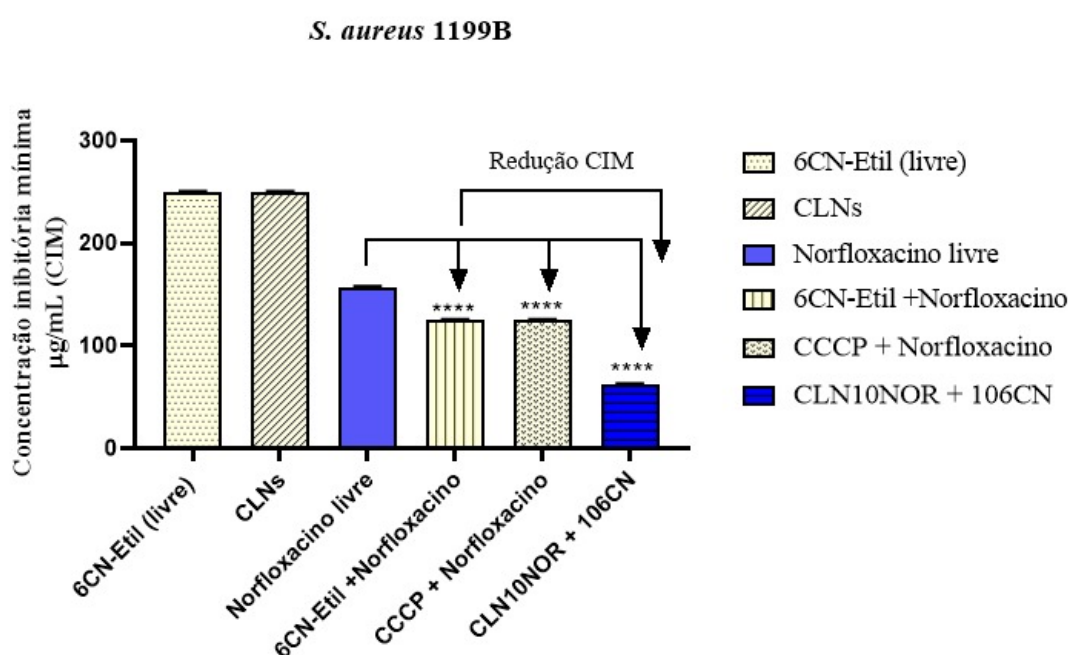
Estudos anteriores relataram que a combinação de antibióticos e inibidores de bomba de efluxo carregados por nanopartículas garantem uma ligação direta ao sítio ativo para o bloqueio da bomba de efluxo e essa combinação resultou na diminuição da concentração da dosagem do antibiótico e do inibidor da bomba de efluxo, reestabelecendo a sensibilidade a antibióticos de várias cepas resistentes, evidenciando a eficiência do efeito sinérgico (Allamyradov *et al.*, 2024).

Na figura 31 são observados os valores das CIM do: derivado tiofênico 6CN-Etil (livre); do norfloxacino (livre); o CLN; da mistura física 6CN-Etil+norfloxacino; do inibidor CCCP+norfloxacino; e do CLN10NOR+106CN, frente a cepa de *S. aureus* 1199B que superexpressa a bomba de efluxo NorA.

Tanto para o grupo com 6CN-Etil livre quanto para o CLN, não foi observada inibição do crescimento de *S. aureus* 1199B ($\text{CIM} > 200 \mu\text{g/mL}$), tendo em vista que a CIM do norfloxacino livre foi menor, o que reforça a ideia de que para que a CIM seja considerada eficaz, ela deve ser inferior à concentração observada para o controle. Esses resultados evidenciam que tanto o grupo do 6CN-Etil, quanto o CLN, são isentos de atividade antibiótica, já que não foram capazes de inibir o crescimento bacteriano de maneira significativa. Para o grupo norfloxacino (livre) a CIM foi determinada em $157,5 \mu\text{g/mL}$, evidenciando resistência da cepa para o norfloxacino. As associações (misturas físicas) do norfloxacino com CCCP e com o 6CN-Etil, promoveram reduções

equivalentes da CIM (125 µg/mL) e significativas diferentes ($P < 0,0001$) da CIM do grupo norfloxacino (livre), evidenciando que o derivado 2-amino tiofênico possui atividade inibitória de bomba de efluxo, isso já relatado na literatura como no estudo de Da Cruz *et al.*, 2020 que demonstrou que derivados tiofênicos foram capazes de modular sensibilidade de cepas resistentes atuando como inibidores de bombas de efluxo aumentando a atividade de antibióticos como ciprofloxacino e eritromicina em cerca de 8 e 16 vezes.

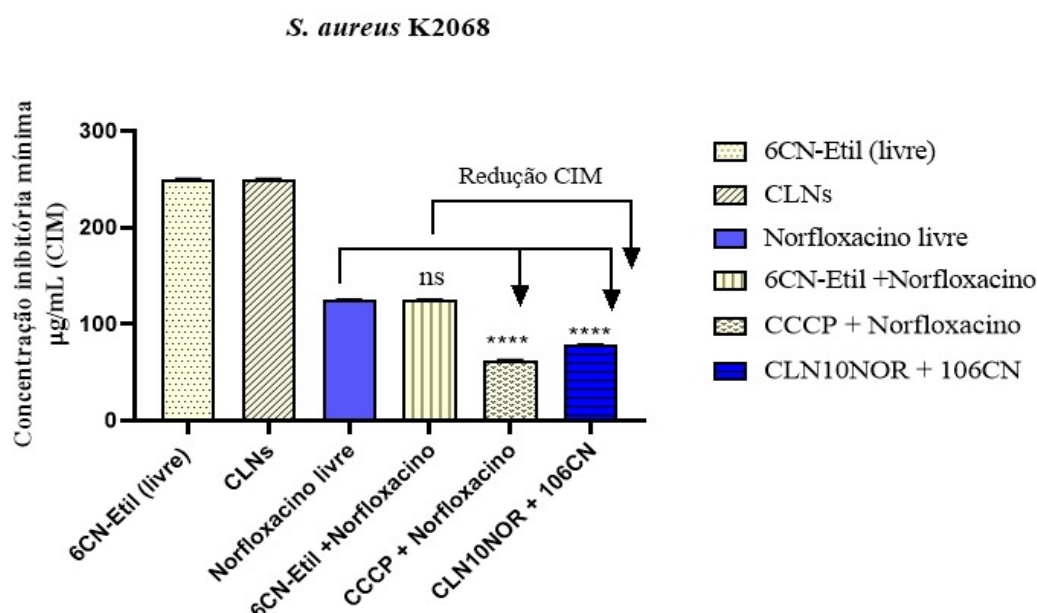
Figura 31: Concentração inibitória mínima (CIM) frente à *S. aureus* 1199B



Por último, o grupo contendo o nanosistema (CLN10NOR+106CN) também foi observada uma redução altamente significativa ($P < 0,0001$) da CIM no grupo CLN10NOR+106CN (CIM = 62,5 µg/mL) em comparação ao grupo Norfloxacino (livre) (CIM = 157,5 µg/mL). O valor de CIM do grupo CLN10NOR+106CN também foi 2 vezes menor que o valor de CIM do grupo CCCP+norfloxacino, que contém um inibidor referência para bomba de efluxo NorA. Esse achado sugere que o carreador não apenas melhora a retenção do norfloxacino nas cepas resistentes, mas também pode ter um efeito inibitório superior ao do CCCP na modulação da bomba de efluxo NorA, sendo essa redução relacionada à ação sinérgica do carreador com o antibiótico contra esse mecanismo de resistência.

Na figura 32 são apresentados os valores das CIM dos mesmos grupos testados anteriormente, porém frente a cepa de *S. aureus* K2068 que superexpressam a bomba de efluxo MepA.

Figura 32: Concentração inibitória mínima (CIM) frente à *S. aureus* K2068



De maneira equivalente ao observado frente a cepa *S. aureus* 1199B, tanto para o os grupos 6CN-Etil livre, quanto CLN (branco) não foi observada inibição satisfatória de crescimentos de *S. aureus* K2068 (CIM > 200 µg/mL) quando relacionado ao norfloxacino, evidenciando que tanto o derivado 2-amino tiofênico, quanto o nanosistema branco são isentos de qualquer atividade antibiótica.

Tanto para o grupo Norfloxacino (livre), quanto para o grupo contendo a mistura física Norfloxacino+6CN-Etil a CIM foi determinada em 125 µg/mL, evidenciando resistência da cepa *S. aureus* K2068 para o norfloxacino, além de indicar incapacidade do derivado 2-amino tiofênico em agir como inibidor da bomba MepA, não contribuindo com o reestabelecimento da sensibilidade da cepa ao norfloxacino.

A CIM do grupo CCCP+Nor (CIM = 62,5 µg/mL) foi significativamente inferior a CIM do grupo Norfloxacino (livre) com valor de $P < 0,0001$, (CIM = 125 µg/mL), comprovando a eficiência do inibidor CCCP em inibir a bomba de efluxo MepA.

Para o grupo do nanosistema (CLN10NOR+106CN) também foi observada uma redução significativa do valor da CIM (CIM = 78,41 µg/mL), quando comparado com os

grupos Norfloxacino (livre) e Norfloxacino+6CN-Etil (CIM = 125 µg/mL) valor de $P < 0,0001$.

Em um estudo publicado por Liu *et al.*, 2016, foi avaliada a atividade antimicrobiana da azitromicina modificada (AZT) e de um peptídeo antibacteriano encapsulados em lipossomas. Os resultados demonstraram que os lipossomas contendo AZT apresentaram concentrações inibitórias mínimas (CIM) menores de 256 µg/mL em comparação ao antibiótico em sua forma livre que sua CIM foi de 512 µg/mL, indicando o efeito antibacteriano do sistema potente e com efeito sinérgico com a AZT. Além disso, uma das formulações que combinava AZT e o peptídeo antibacteriano revelou efeitos sinérgicos significativos, destacando um grande potencial para o combate a infecções causadas por cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA).

Somado a isso, também é bastante abordado na literatura as nanopartículas metálicas como agentes antimicrobianos, apresentando eficácia contra uma ampla variedade de cepas, incluindo as multirresistentes, além de também quando combinadas com antibióticos como o ciprofloxacino potencializaram a ação dos mesmos a partir de um efeito sinérgico, diminuindo a CIM para concentrações extremamente menores quando comparado ao antibiótico livre (Gupta *et al.*, 2017; Eleftheriadou *et al.*, 2021). Nanopartículas poliméricas de PLGA além de serem biocompatíveis e biodegradáveis, permitem um controle mais preciso da liberação do fármaco, prolongando seu efeito terapêutico e reduzindo a toxicidade sistêmica quando encapsuladas com teicoplanina, apresentaram resultados excepcionais contra MRSA, tendo em vista que os valores de CIM foram 2x menores do que o antibiótico livre e quando o sistema funcionalizados com aptâmeros diminuíram 64 x, demonstrando especificidade desse sistema para o alvo bacteriano. Quanto a estudos com nanopartículas lipídicas sólidas o uso dessas nanopartículas em sistemas antimicrobianos tem demonstrado potencial para reduzir os efeitos adversos e prolongar o tempo de circulação no organismo em um estudo para a encapsulação de vancomicina apresentaram resultados excelentes, levaram a uma redução de 22 x em comparação com o fármaco livre com cepas MRSA, demonstrando que o uso de nanosistemas oferece uma abordagem inovadora e promissora para o combate a resistência antibacteriana (Andrade *et al.*, 2023).

Diante dos resultados expostos, para a cepa de *S. aureus* 1199B, foi constatado a redução significativa ($P < 0,0001$) da CIM no grupo CLN10NOR+106CN (CIM = 62,5 µg/mL) em comparação do grupo contendo a mistura física 6CN-Etil+norfloxacino (125

µg/mL), evidenciando que a incorporação do norfloxacino com o 6CN-Etil em um carregador lipídico nanoestruturado promoveu uma modulação da atividade antibiótica/adjuvante de antibiótica das 2 moléculas quando administradas em associação, sendo bastante eficiente em reestabelecer a sensibilidade da cepa *S. aureus* 1199B ao norfloxacino. Esses resultados demonstram que a incorporação do norfloxacino com o 6CN-Etil no nanosistema promoveram a modulação da atividade adjuvante de antibiótica (inibitória de bomba de efluxo) do derivado tiofênico 6CN-Etil na cepa *S. aureus* K2068. Importante destacar que, conforme observado, sem o nanosistema, o derivado 6CN-Etil não apresentou atividade inibitória sobre a bomba de efluxo MepA (CIM = 125 µg/mL).

Por tanto, os resultados apresentados sugerem demonstram que a preparação de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo 6CN-etil e norfloxacino promovem modulação aa ação da norfloxacino frente cepas portadoras de NorA e MepA indicando a possível participação e ação desse encapsulado contendo 6CN-etil nas rotas de inibição de bombas de efluxo NorA e MepA. Além disso esses resultados evidenciam que o encapsulamento causa melhoramento da atividade dos compostos quando se compara a ação da norfloxacino e 6CN-Etil fora do encapsulado.

6. CONCLUSÃO

A obtenção de um carreador lipídico nanoestruturado contendo 6CN-Etil e norfloxacino foi desenvolvido com sucesso pelo método de emulsão a quente por sonicação seguida de liofilização. Foi possível desenvolver e validar um método para a quantificação simultânea do norfloxacino e 6CN-Etil por CLAE. A avaliação da CIM nas cepas *S. aureus* 1199B que superexpressam a bomba de efluxo NorA, e *S. aureus* K2068 que superexpressam a bomba de efluxo MepA mostrou que o carreador lipídico nanoestruturado contendo norfloxacino e 6CN-Etil promoveram para ambas as cepas: reduções significativas das CIM quando comparados com a mistura física do norfloxacino e 6CN-Etil; e para a cepa *S. aureus* K2068, promoveu a modulação da atividade adjuvante de antibiótica (inibitória de bomba de efluxo) do derivado tiofênico 6CN-Etil. Portanto os carreadores lipídicos nanoestruturados contendo o inibidor de bombas de efluxo 6CN-Etil e o antibiótico norfloxacino se mostraram uma abordagem promissora para terapêutica das infecções causadas por bactérias resistentes, promovendo reestabelecimento da sensibilidade bacteriana ao antibiótico, podendo prolongar seu uso clínico, abrindo uma nova perspectiva terapêutica para uma questão tão emergente quanto a resistência antimicrobiana.

REFERÊNCIAS

ABLA, K. K., HIJAZI, S. M., MEHANNA, M. M. Augmented efficiency of azithromycin for MRSA ocular infections management: Limonene-based nanostructured lipid carriers in-situ approach, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 87, p. 104764, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104764>.

ABUSHAHEEN, M. A.; MUZAHEED; FATANI, A. J.; ALOSAIMI, M.; MANSY, W.; GEORGE, M.; ACHARYA, S.; RATHOD, S.; DIVAKAR, D. D.; JHUGROO, C.; VELLAPPALLY, S.; KHAN, A. A.; SHAIK, J.; JHUGROO, P. Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. *Disease-a-Month*, v. 66, p. 100971, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2020.100971>

AFLAKIAN, F.; MIRZAVI, F.; AIYELABEGAN, H. T.; SOLEIMANI, A.; GHOLIZADEH NAVASHENAQ, J.; KARIMI-SANI, I.; RAFATI ZOMORODI, A.; VAKILI-GHARTAVOL, R. Nanoparticles-based therapeutics for the management of bacterial infections: A special emphasis on FDA approved products and clinical trials. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 188, p. 106515, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2023.106515>.

AKBARI, J., SAEEDI, M., AHMADI, F., HASHEMI, S. M. H., BABAEI, A., YADDOLLAHI, S., ROSTAMKALAEI, S. S., ASARE, K., NOKHODCHI, A. (2022). Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: a review of the methods of manufacture and routes of administration. *Pharmaceutical development and technology*, v. 27(5), p. 525–544. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10837450.2022.2084554>

AL-HAJ, W. A.; NSAIRAT, H.; EL-TANANI, M. Pimozide-loaded nanostructured lipid carriers: Repurposing strategy against lung cancer. *Science progress*, v. 107, p. 1–18, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/00368504241296304>

ALLAMYRADOV, Y.; YOSEF, J. ben; KYLYCHBEKOV, S.; MAJIDOV, I.; KHUZHAKULOV, Z.; ER, A. Y.; KITCHENS, C.; BANGA, S.; ER, A. O. The role of efflux pump inhibitor in enhancing antimicrobial efficiency of Ag NPs and MB as an effective photodynamic therapy agent. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 47, p. 104212, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2024.104212>.

ALMATAR, M., ALBARRI, O., MAKKY, E. A., KOKSAL, F. Efflux pump inhibitors: new updates, *Pharmacological Reports*, v. 73, p. 1–16, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s43440-020-00160-9>.

ANDRADE, S., RAMALHO, M. J., SANTOS, S. B., MELO, L. D. R., SANTOS, R. S., GUIMARÃES, N., AZEVEDO, N. F., LOUREIRO, J. A., PEREIRA, M. C. Fighting Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* with Targeted Nanoparticles. *International journal of molecular sciences*, v. 24(10), p. 9030. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms24109030>

APOSTOLOU, M.; ASSI, S.; FATOKUN, A. A.; KHAN, I. The Effects of Solid and Liquid Lipids on the Physicochemical Properties of Nanostructured Lipid Carriers. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 110, p. 2859–2872, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2021.04.012>.

ARYA, S. PATIDAR, R.; RAY, D.; ASWAL, V. K.; RANJAN, N.; BAHADUR, P.; TIWARI, S. Structural transitions in TPGS micelles induced by trehalose as a model cryoprotectant. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, [s.l.], v. 642, p. 128714, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2022.128714>

BABOUEE, F. B.; ANDREY, D.; KOHLER, P. Antibiotics' collateral effects on the gut microbiota in the selection of ESKAPE pathogens. *CMI Communications*, v. 1, p. 100012, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cmicom.2024.100012>

BARAN, A.; KWIATKOWSKA, A.; POTOCKI, L. Antibiotics and Bacterial Resistance—A Short Story of an Endless Arms Race. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, p. 5777, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms24065777>

BASAK, M.; RAHMAN, M. L.; AHMED, M. F.; BISWAS, B.; SHARMIN, N. The use of X-ray diffraction peak profile analysis to determine the structural parameters of cobalt ferrite nanoparticles using Debye-Scherrer, Williamson-Hall, Halder-Wagner and Size-strain plot: Different precipitating agent approach. *Journal of Alloys and Compounds*, v. 895, p. 162694, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2021.162694>

BHATT, S., CHATTERJEE, S. Fluoroquinolone antibiotics: Occurrence, mode of action, resistance, environmental detection, and remediation – A comprehensive review,

Environmental Pollution, v. 315, p. 120440, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120440>.

BRAR, R. K.; JYOTI, U.; PATIL, R. K.; PATIL, H. C. Fluoroquinolone antibiotics: An overview. *Adesh University Journal of Medical Sciences & Research*, v. 2, p. 26–30, 2020. Disponível em: <https://aujmsr.com/fluoroquinolone-antibiotics-an-overview/>

BRAWLEY, D. N.; SAUER, D. B.; LI, J.; ZHENG, X.; KOIDE, A.; JEDHE, G. S.; SUWATTHEE, T.; SONG, J.; LIU, Z.; ARORA, P. S.; KOIDE, S.; TORRES, V. J.; WANG, D. N.; TRAASETH, N. J. Structural basis for inhibition of the drug efflux pump NorA from *Staphylococcus aureus*. *Nature Chemical Biology*, v. 18, p. 706–712, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41589-022-00994-9>

BUCKLEY, H. L.; TOUCHBERRY, C. H.; MCKINLEY, J. P.; MATHE, Z. S.; MURADYAN, H.; LING, H.; FADADU, R. P.; MULVIHILL, M. J.; AMROSE, S. E. Renewable additives that improve water resistance of cellulose composite materials. *Journal of Renewable Materials*, v. 5, p. 1–13, 2017. <https://doi.org/10.7569/JRM.2016.634109>

CASTRO, S. R.; RIBEIRO, L. N. M.; BREITKREITZ, M. C.; GUILHERME, V. A.; RODRIGUES DA SILVA, G. H.; MITSUTAKE, H.; ALCÂNTARA, A. C. S.; YOKAICHIYA, F.; FRANCO, M. K. K. D.; CLEMENS, D.; KENT, B.; LANCELLOTTI, M.; DE ARAÚJO, D. R.; DE PAULA, E. A pre-formulation study of tetracaine loaded in optimized nanostructured lipid carriers. *Scientific Reports*, v. 11, p. 1–15, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99743-6>.

CHANDAL, N., TAMBAT, R., KALIA, R., GAUTAM, K., MAHEY, N., JACHAR, S., NANDANWAR, H. Efflux pump inhibitory potential of indole derivatives as an arsenal against norA over-expressing *Staphylococcus aureus*. *Microbiology spectrum* v. 11, p. 0487622, 2023. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/spectrum.04876-22>

CHAUHAN, I.; YASIR, M.; VERMA, M.; SINGH, A. P. Nanostructured lipid carriers: A groundbreaking approach for transdermal drug delivery. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, v. 10, p. 150–165, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.34172/apb.2020.021>.

CHEN, C. Y.; LEE, Y. H.; CHANG, S. H.; TSAI, Y. F.; FANG, J. Y.; HWANG, T. L. Oleic acid-loaded nanostructured lipid carrier inhibit neutrophil activities in the presence

of albumin and alleviates skin inflammation. *International Journal of Nanomedicine*, v. 14, p. 6539–6553, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/IJN.S208489>

CHEUNG, G. Y. C., BAE, J. S., OTTO, M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*, v. 12(1), p. 547–569. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1878688>

COMPAGNE, N., VIEIRA DA CRUZ, A., MÜLLER, R. T., Hartkoorn, R. C., Flipo, M., Pos, K. M. Update on the Discovery of Efflux Pump Inhibitors against Critical Priority Gram-Negative Bacteria, *Antibiotics*, v. 12, p. 180, 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36671381/>

CORTÉS, H.; HERNÁNDEZ-PARRA, H.; BERNAL-CHÁVEZ, S. A.; DEL PRADO-AUDELO, M. L.; CABALLERO-FLORÁN, I. H.; BORBOLLA-JIMÉNEZ, F. V.; GONZÁLEZ-TORRES, M.; MAGAÑA, J. J.; LEYVA-GÓMEZ, G. Non-ionic surfactants for stabilization of polymeric nanoparticles for biomedical uses. *Materials*, v. 14, p. 3197, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ma14123197>

CLSI, *M100ED29E. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 29th Informational Supplement*. 20; 29th ed.; 2019; ISBN 9781684400324. Disponível em: <https://clsi.org>

DA COSTA, R. H. S., ROCHA, J. E., de FREITAS, T. S., PEREIRA, R. L. S., JUNIOR, F. N. P., DE OLIVEIRA, M. R. C., BATISTA, F. L. A., COUTINHO, H. D. M., DE MENEZES, I. R. A. Evaluation of antibacterial activity and reversal of the NorA and MepA efflux pump of estragole against *Staphylococcus aureus* bacteria. *Archives of Microbiology*, v. 203, p. 3551–3555, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02347-x>.

DA CRUZ, R. M. D., ZELLI, R., BENSHAIN, S., DA CRUZ, R. M. D., SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P., DÉCOUT, J. L., MINGEOT-LECLERCQ, M. P., MENDONÇA-JUNIOR, F. J. B Synthesis and Evaluation of 2-Aminothiophene Derivatives as *Staphylococcus aureus* Efflux Pump Inhibitors, *ChemMedChem*, v. 15, p. 716–725, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32073756/>

DASHTBANI, R. A.; BROWN, M. H. Efflux pump mediated antimicrobial resistance by staphylococci in health-related environments: Challenges and the quest for inhibition.

Antibiotics, v. 10, p. 1502, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antibiotics10121502>

DENISSEN, J., REYNEKE, B., WASO-REYNEKE, M., HAVENGA, B., BARNARD, T., KHAN, S., KHAN, W. Prevalence of ESKAPE pathogens in the environment: Antibiotic resistance status, community-acquired infection and risk to human health, *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, v. 244, p. 114006, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2022.114006>.

DEUSENBERRY, C.; WANG, Y.; SHUKLA, A. Recent Innovations in Bacterial Infection Detection and Treatment. *ACS Infectious Diseases*, v. 7, p. 695–720, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00890>

DIAS, K. J. S. D. O.; MIRANDA, G. M.; BESSA, J. R.; ARAÚJO, A. C. J. De; FREITAS, P. R.; ALMEIDA, R. S. De; PAULO, C. L. R.; NETO, J. B. D. A.; COUTINHO, H. D. M.; RIBEIRO-FILHO, J. Terpenes as bacterial efflux pump inhibitors: A systematic review. *Frontiers in Pharmacology*, v. 13, n., p. 1–12, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.953982>.

DUAN, Y.; DHAR, A.; PATEL, C.; KHIMANI, M.; NEOGI, S.; SHARMA, P.; SIVA KUMAR, N.; VEKARIYA, R. L. A brief review on solid lipid nanoparticles: Part and parcel of contemporary drug delivery systems. *RSC Advances*, v. 10, p. 26777–26791, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/D0RA03491F>

DUVAUCHELLE, V.; MEFFRE, P.; BENFODDA, Z. Green methodologies for the synthesis of 2-aminothiophene. *Environmental Chemistry Letters*, v. 21, p. 597–621, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10311-022-01482-1>.

ELEFTHERIADOU, I.; GIANNOUSI, K.; PROTONOTARIOU, E.; SKOURA, L.; ARSENAKIS, M.; DENDRINO-SAMARA, C.; SIVROPOULOU, A. Cocktail of CuO, ZnO, or CuZn Nanoparticles and Antibiotics for Combating Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Efflux Pump Inhibition. *ACS Applied Nano Materials*, v. 4, p. 9799–9810, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsanm.1c02208>

ELERAKY, N. E.; OMAR, M. M.; MAHMOUD, H. A.; ABOU-TALEB, H. A. Nanostructured lipid carriers to mediate brain delivery of Temazepam: Design and in vivo

study. *Pharmaceutics*, v. 12, p. 451 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12050451>

FADLELMOULA, A.; PINHO, D.; CARVALHO, V. H.; CATARINO, S. O.; MINAS, G. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy to Analyse Human Blood over the Last 20 Years: A Review towards Lab-on-a-Chip Devices. *Micromachines*, v. 13, p. 187, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/mi13020187>

FAHMY, U. A., AHMED, O. A. A., BADR-ELDIN, S. M., ALDAWSAR, H.M., OKBAZGHI, S.Z., AWAN, Z.A., BAKHREBAH, M.A., ALOMARY, M.N., ABDULAAL, W.H., MEDINA, C., ALHAKAMY, N.A. Optimized nanostructured lipid carriers integrated into in situ nasal gel for enhancing brain delivery of flibanserine, *International Journal of Nanomedicine*, v. 15, p. 5253–5264, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7386805/>

FREIRE, N. B.; PIRES, L. C. S. R.; OLIVEIRA, H. P.; COSTA, M. M. Atividade antimicrobiana e antibiofilme de nanopartículas de prata sobre isolados de *Aeromonas* spp. obtidos de organismos aquáticos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 38, p. 244–249, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-4805>

FREITAS, T. S., XAVIER, J. C., PEREIRA, R. L., ROCHA, J. E., CAMPINA, F. F., NETO, J. B. A., SILVA, M. M. C., BARBOSA, C. R. S., MARINHO, E. S., NOGUEIRA, C. E. S., SANTOS, H. S., COUTINHO, H. D. M., TEIXEIRA, A. M. R. In vitro and in silico studies of chalcones derived from natural acetophenone inhibitors of NorA and MepA multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. *Microbial Pathogenesis*, v. 161, p. 105286, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34793877/>

GALVÃO, J. G. Desenvolvimento de carreadores lipídicos nanoestruturados para o encapsulamento de carvacrol: uma formulação promissora para o tratamento de leishmanioses. 2019. Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2019. Disponível em: <https://ri.ufs.br/handle/riufs/12504>

GUIARD, B. P.; GOTTI, G. The High-Precision Liquid Chromatography with Electrochemical Detection (HPLC-ECD) for Monoamines Neurotransmitters and Their Metabolites: A Review. *Molecules*, v. 29, p. 1–15, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules29020496>

GUPTA, D.; SINGH, A.; KHAN, A. U. Nanoparticles as Efflux Pump and Biofilm Inhibitor to Rejuvenate Bactericidal Effect of Conventional Antibiotics. *Nanoscale Research Letters*, v. 12, p. 9–11, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s11671-017-2222-6>

GWERYINA, R. I.; KURA, M. Y.; ASHEZUA, T. T. Optimal control model for the infectiology of staphylococcus aureus with dual transmission pathways. *Results in Control and Optimization*, v. 14, p. 100364, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rico.2023.100364>.

HAIDER, M.; ABDIN, S. M.; KAMAL, L.; ORIVE, G. Nanostructured lipid carriers for delivery of chemotherapeutics: A review. *Pharmaceutics*, v. 12, p. 288, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12030288>

HASLUND, G. B. S.; HOU, J.; WOLOSZCZUK, K.; HORN, E. J.; DEMPSEY, G.; HADDAD, E. K.; WIGDAHL, B.; COMUNALE, M. A. Host glycosylation of immunoglobulins impairs the immune response to acute Lyme disease. *eBioMedicine*, v. 100, p. 104979, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2024.104979>.

HU, D.; ZOU, L.; GAO, Y.; JIN, Q.; JI, J. Emerging nanobiomaterials against bacterial infections in postantibiotic era. *View*, v. 1, p. 1–19, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/VIW.20200014>

HU, F. Q.; JIANG, S. P.; DU, Y. Z.; YUAN, H.; YE, Y. Q.; ZENG, S. Preparation and characterization of stearic acid nanostructured lipid carriers by solvent diffusion method in an aqueous system. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 45, p. 167-173, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2005.08.005>.

HUANG, H.; WAN, P.; LUO, X.; LU, Y.; LI, X.; XIONG, W.; ZENG, Z. Tigecycline Resistance-Associated Mutations in the MepA Efflux Pump in Staphylococcus aureus. *Microbiology Spectrum*, v. 11, p. 63423, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/spectrum.00634-23>

HUANG, L.; WU, C.; GAO, H.; XU, C.; DAI, M.; HUANG, L.; HAO, H.; WANG, X.; CHENG, G. Bacterial Multidrug Efflux Pumps at the Frontline of Antimicrobial Resistance: An Overview. *Antibiotics*, v. 11, p. 520, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antibiotics11040520>

KHAIRNAR, S. V.; PAGARE, P.; THAKRE, A.; NAMBIAR, A. R.; JUNNUTHULA, V.; ABRAHAM, M. C.; KOLIMI, P.; NYAVANANDI, D.; DYAWANAPELLY, S. Review on the Scale-Up Methods for the Preparation of Solid Lipid Nanoparticles. *Pharmaceutics*, v. 14, p. 5691–5700, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14091886>

KHAN, M. A.; KHAN, S.; KAZI, M.; ALSHEHRI, S. M.; SHAHID, M.; KHAN, S. U.; HUSSAIN, Z.; SOHAIL, M.; SHAFIQUE, M.; HAMID, H. A.; KAMRAN, M.; ELHISSI, A.; WASIM, M.; THU, H. E. Norfloxacin loaded lipid polymer hybrid nanoparticles for oral administration: Fabrication, characterization, in silico modelling and toxicity evaluation. *Pharmaceutics*, v. 13, p. 1632, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101632>

KHAN, S.; SHARMA, A.; JAIN, V. An overview of nanostructured lipid carriers and its application in drug delivery through different routes. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, v. 13, p. 446–460, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.34172/apb.2023.056>.

KOLMAN, R. K.; OCHOŃSKA, D.; BRZYCHCZY-WŁOCH, M.; PAMUŁA, E. Stearic acid-based nanoparticles loaded with antibacterial peptides – Bacitracin and LL-37: Selection of manufacturing parameters, cytocompatibility, and antibacterial efficacy. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 667, 124876, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2024.124876>.

KROCHMAL, K. B.; WICHER, D. R. The minimum inhibitory concentration of antibiotics: Methods, interpretation, clinical relevance. *Pathogens*, v. 10, p. 1–21, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pathogens10020165>

KUMAR, G., KIRAN TUDU, A. Tackling multidrug-resistant Staphylococcus aureus by natural products and their analogues acting as NorA efflux pump inhibitors, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 80, p. 117187, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2023.117187>.

KUMAWAT, M., NABI, B., DASWANI, M., VIGUAR, I., PAL, N., SHARMA, P., TIWARI, S., SARMA, D. K., SHUBHAM, S., KUMAR, M. Role of bacterial efflux pump proteins in antibiotic resistance across microbial species, *Microbial Pathogenesis*, v. 181, p. 106182, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106182>.

ICH, INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. ICH Harmonised Tripartite Guideline Q2(R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. Geneva: ICH, 2005. Disponível em: https://database.ich.org/sites/default/files/Q2_R1__Guideline.pdf.

IDRIS, A. H., CHE ABDULLAH, C. A., YUSOF, N. A., ASMAWI, A. A., & ABDUL RAHMAN, M. B. (2023). Nanostructured Lipid Carrier Co-Loaded with Docetaxel and Magnetic Nanoparticles: Physicochemical Characterization and In Vitro Evaluation. *Pharmaceutics*, v. 15(5), p. 1319, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15051319>

LATIFAH, L.; HENDRADI, E.; ISADIARTUTI, D. Effect ratio of stearic acid and oleic acid on characteristics of diclofenac sodium nanostructured lipid carrier. *Pharmacy Education*, v. 24, p. 336–342, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.46542/pe.2024.243.336342>

LI, L.; MA, J.; YU, Z.; LI, M.; ZHANG, W.; SUN, H. Epidemiological characteristics and antibiotic resistance mechanisms of *Streptococcus pneumoniae*: An updated review. *Microbiological Research*, v. 266, p. 127221, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127221>

LI, T., WANG, Z., GUO, J., NUNEZ, C. L. F., WANG, J., HAN, B., TAO, H., LIU, J., WANG, X. Bacterial resistance to antibacterial agents: Mechanisms, control strategies, and implications for global health, *Science of the Total Environment*, v. 860, p. 160461, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160461>.

LIANG, D., LI, F., DUAN, J., SUN, W., & YU, X. (2024). Two Novel Hydrate Salts of Norfloxacin with Phenolic Acids and Their Physicochemical Properties. *Antibiotics. Basel, Switzerland*, v. 13(9), p. 888. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antibiotics13090888>

LIU, J.; PERES, S.L; KARAMCHED, P.; WILKINSON, A.J; GROVENOR, C. R. M. Forescattered electron imaging of nanoparticles in scanning electron microscopy. *Materials Characterization*, [s.l.], v. 155, p. 109814, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.matchar.2019.109814>

LIU, X.; LI, Z.; WANG, X.; CHEN, Y.; WU, F.; MEN, K.; XU, T.; LUO, Y.; YANG, L. Novel antimicrobial peptide-modified azithromycin-loaded liposomes against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Nanomedicine*, v. 11, p. 6781–6794, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.12722110.2147/IJN.S107107>

MALDONADO, J.; CZARNECKA, B.; HARMON, D. E.; RUIZ, C. The multidrug efflux pump regulator AcrR directly represses motility in *Escherichia coli*. *mSphere*, v. 8, p. 42032, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/msphere.00430-23>

MANSUR, H. S.; SADAHIRA, C. M.; SOUZA, A. N.; MANSUR, A. A. P. FTIR spectroscopy characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde. *Materials Science and Engineering: C*, v. 28, p. 539-548, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2007.10.088>.

MATARAZZO, A. P.; RIOS, C. A.; GERÔNIMO, G.; ONDEI, R.; DE PAULA, E.; BREITKREITZ, M. C. Development of a Versatile Nanostructured Lipid Carrier (NLC) Using Design of Experiments (DoE)—Part II: Incorporation and Stability of Butamben with Different Surfactants. *Pharmaceutics*, v. 16, p. 863, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16070863>

MARTIN, A. L. A. R., PEREIRA, R. L. S., ROCHA, J. E., FARIAS, P. A. M., FREITAS, T. S., CALDAS, F. R. L., FIGUEREDO, F. G., SAMPAIO, N. F. L., OLIVEIRA, C. D. M., TINTINO, S. R., HORA, G. C. A., LIMA, M. C. P., de MENEZES, I. R. A., CARVALHO, D. T., COUTINHO, H. D. M., FONTELES, M. M. F. Unlocking bacterial defense: Exploring the potent inhibition of NorA efflux pump by coumarin derivatives in *Staphylococcus aureus*. *Microbial pathogenesis*, v. 190, p. 106608, 2024 Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2024.106608>

MONTEIRO, K. L. C., DE AQUINO, T. M., MENDONÇA JUNIOR, F. J. B. An Update on *Staphylococcus aureus* NorA Efflux Pump Inhibitors, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 20, p. 2168–2185, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32621719/>

PARKER, A. M.; JACKSON, N.; AWASTHI, S.; KIM, H.; ALWAN, T.; WYLLIE, A. L.; KOGUT, K.; HOLLAND, N.; MORA, M.; ESKENAZI, B.; RILEY, L. W.;

LEWNARD, J. A. Upper respiratory Streptococcus pneumoniae colonization among working-age adults with prevalent exposure to overcrowding Anna. *Microbiology Spectrum*, v. 12, p. 87924, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/spectrum.00879-24>

PASQUA, M.; GROSSI, M.; ZENNARO, A.; FANELLI, G.; MICHELI, G.; BARRAS, F.; COLONNA, B.; PROSEDA, G. The varied role of efflux pumps of the mfs family in the interplay of bacteria with animal and plant cells. *Microorganisms*, v. 7, p. 10–12, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090285>

PEREIRA, L. C.; BOM, M.; RIBEIRO, A.; ALMEIDA, C.; ROSADO, C. Exploring Stearic-Acid-Based Nanoparticles for Skin Applications-Focusing on Stability and Cosmetic Benefits. *Cosmetics*, v. 10, p. 1–15, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cosmetics10040099>

POCHAPSKI, D. J.; CARVALHO DOS SANTOS, C.; LEITE, G. W.; PULCINELLI, S. H.; SANTILLI, C. V. Zeta Potential and Colloidal Stability Predictions for Inorganic Nanoparticle Dispersions: Effects of Experimental Conditions and Electrokinetic Models on the Interpretation of Results. *Langmuir*, v. 37, p. 13379–13389, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.1c02056>

RAJAEI, B. M.; MORADI, F.; DEZHKAM, A.; KHASHEI, R. Vancomycin-resistant Enterococcus faecium bacteremia in End-Stage Renal Disease (ESRD) and Focal Segmental Glomerulosclerosis (FSGS) patient under hemodialysis. *Heliyon*, v. 10, p. e36028, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e36028>.

RAMIREZ, L. M. F.; RIHOUEY, C.; CHAUBET, F.; CERF, D.L.; PICTON, L. Characterization of dextran particle size: How frit-inlet asymmetrical flow field-flow fractionation (FI-AF4) coupled online with dynamic light scattering (DLS) leads to enhanced size distribution. *Journal of Chromatography A*, v. 1653, p. 462404, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462404>

ROCHA, B. de A.; VIANA, M. C.; SILVEIRA, J. V. W. da; CARNEIRO, G. Low-cost method for quantification of salicylic acid loaded in lipid nanoparticles containing copaiba oil. *Research, Society and Development*, v. 11, p. e274111133419, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i11.33419>

RUSU, A.; MUNTEANU, A. C.; ARBĂNAȘI, E. M.; UIVAROSI, V. Overview of Side-Effects of Antibacterial Fluoroquinolones: New Drugs versus Old Drugs, a Step Forward in the Safety Profile? *Pharmaceutics*, v. 15, p. 804, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15030804>

SABNIS, R. W. e RANGNEKAR, D. W. e SONAWANE, N. D. 2-Aminothiophenes by the Gewald Reaction. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, v. 36, p. 333, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jhet.5570360203>

SAKELLARI, G. I.; ZAFEIRI, I.; BATCHELOR, H.; SPYROPOULOS, F. Formulation design, production and characterisation of solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for the encapsulation of a model hydrophobic active. *Food Hydrocolloids for Health*, v. 1, p. 100024, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fhfh.2021.100024>.

SALVI, V. R., PAWAR, P. Nanostructured lipid carriers (NLC) system: A novel drug targeting carrier, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 51, p. 255–267, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.02.017>.

SAMREEN, AHMAD, I., MALAK, H. A., ABULREESH, H. H. Environmental antimicrobial resistance and its drivers: a potential threat to public health, *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, v. 27, p. 101–111, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2021.08.001>.

SCHUBERT, M. A.; HARMS, M.; MÜLLER-GOYMANN, C. C. Structural investigations on lipid nanoparticles containing high amounts of lecithin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 27, p. 226-236, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2005.10.004>.

SHI, J. Y.; CAI, W. Q.; LUO, X. T.; SU, B. L.; XIAO, J. W.; ZHANG, G. R.; YANG, Q. Q.; ZHANG, B. B. Delivery of natural Monascus yellow pigment using zein-lecithin nanoparticles: Fabrication, characterization, and in vitro release properties. *Biochemical Engineering Journal*, v. 197, p. 108992, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2023.108992>.

SILVA, T. M. L. Desenvolvimento e validação de metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência (clae) para pesquisa de enrofloxacin e ciprofloxacina em dejetos de

poedeiras. 2019. Dissertação (Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais) Minas Gerais, 2019, Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/>

SOUZA, M. L. Carreador lipídico nanoestruturado contendo antimoniato de meglumina como alternativa terapêutica de uso oral contra a leishmaniose. 2022. Tese (Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica) Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/>

SUBRAMANIAM, B.; SIDDIK, Z. H.; NAGOOR, N. H. Development and validation of a reversed-phase HPLC method for quantification of 1'-acetoxychavicol acetate content in a nanostructured lipid carrier formulation. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 58, p. 1–13, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s2175-97902022e20627>

SYED, A. S. N. A.; ASHARI, S. E.; TAN, J. K.; KASSIM, N. K.; HASSAN, M.; ZAINUDDIN, N.; MOHAMAD, R.; MAT AZMI, I. D. Screening and selection of formulation components of nanostructured lipid carriers system for *Mitragyna Speciosa* (Korth). Haval drug delivery. *Industrial Crops and Products*, v. 198, p. 116668, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116668>.

TAHA, A.; AHMED, E.; ISMAIEL, A.; ASHOKKUMAR, M.; XU, X.; PAN, S.; HU, H. Ultrasonic emulsification: An overview on the preparation of different emulsifiers-stabilized emulsions. *Trends in Food Science and Technology*, v. 105, p. 363–377, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.09.024>.

TANG, C. H.; CHEN, H. L.; DONG, J. R. Solid Lipid Nanoparticles (SLNs) and Nanostructured Lipid Carriers (NLCs) as Food-Grade Nanovehicles for Hydrophobic Nutraceuticals or Bioactives. *Applied Sciences (Switzerland)*, v. 13, p. 1726, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/app13031726>

THANGADURAI, S.; SHUKLA, S. K.; SRIVASTAVA, A. K.; ANJANEYULU, Y. X-ray powder diffraction patterns for certain fluoroquinolone antibiotic drugs. *Acta Pharmaceutica*, v. 53, p. 295–303, 2003. Disponível em: <https://acta.pharmaceutica.farmaceut.org/materials/pdf/Thangadurai.pdf>

THAHER, Y. A.; SATOOF, A.; KAMAL, A.; ALMANI, D.; SHABAN, D.; KASSAB, G.; SURCHI, H.; ABU-QTAISH, H.; FATOUH, J.; AJALEH, S. A. Chapter 7 - Instrumental analytical techniques for physicochemical characterization of bio-

nanomaterials. ***Handbook on Nanobiomaterials for Therapeutics and Diagnostic Applications***, v. 1, p. 133–150, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821013-0.00011-8>

TENCHOV, R.; BIRD, R.; CURTZE, A. E.; ZHOU, Q. Lipid Nanoparticles from Liposomes to mRNA Vaccine Delivery, a Landscape of Research Diversity and Advancement. ***ACS Nano***, v. 15, p. 16982–17015, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsnano.1c04996>

TRENKENSCHUH, E.; FRIESS, W. Freeze-drying of nanoparticles: How to overcome colloidal instability by formulation and process optimization. ***European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics***, [s.l.], v. 165, p. 345–360, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2021.05.024>

TINTINO, C. D. M. O. **Avaliação da atividade antibacteriana e inibidora de bombas de efluxo em cepas de *Staphylococcus aureus* por 1,8-naftiridinas sulfonamídicas: abordagem *in vitro* e *in silico***. 2021. Tese. (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Pernambuco) Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2021. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/>

VEIDER, F.; AKKUŞ-DAĞDEVIREN, Z. B.; KNOLL, P.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Design of nanostructured lipid carriers and solid lipid nanoparticles for enhanced cellular uptake. ***International Journal of Pharmaceutics***, v. 624, p. 122014 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122014>

VERMA, P.; TIWARI, M.; TIWARI, V. Strategies to Combat Bacterial Antimicrobial Resistance: a Focus on Mechanism of the Efflux Pumps Inhibitors. ***SN Comprehensive Clinical Medicine***, v. 3, p. 510–527, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42399-021-00780-z>

VITNOR, A., KHANDRE, R. A review on high performance liquid chromatography. ***International Journal of Scientific Development and Research***, v. 7, p. 2455-2631, 2022. Disponível em: <https://www.ijedr.org/papers/IJSDR2212086.pdf>

WAY, Y. A.; HUANG, C. W.; LIAO, W. C.; LI, S. W.; CHIANG, R. L.; HSING, E. W.; PAN, Y. J.; SHIE, S. Sen; HSIEH, Y. C. Sequential use of capsular typing and whole-genome sequencing-based analysis for transmission of carbapenem-resistant

Acinetobacter baumannii in a tertiary medical center. ***Journal of Microbiology, Immunology and Infection***, v. 57, p. 916-925, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2024.08.014>.

WOO, J. O.; MISRAN, M.; LEE, P. F.; TAN, L. P. Development of a controlled release of salicylic acid loaded stearic acid-oleic acid nanoparticles in cream for topical delivery. ***The Scientific World Journal***, v. 2014, p. 205703 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2014/205703>

YAKUPOVA, L. R., KOPNOVA, T. Y., SKUREDINA, A. A., KUDRYASHOVA, E. V. Effect of Methyl- β -Cyclodextrin on the Interaction of Fluoroquinolones with Human Serum Albumin, ***Russian Journal of Bioorganic Chemistry***, v. 48, p. 163–172, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1134/S1068162022010149>

YI, Y., YAO, J., XU, W., WANG, L.-M., & WANG, H.-X. Investigation on the quality diversity and quality-FTIR characteristic relationship of sunflower seed oils. ***RSC Advances***, v. 9(47), p. 27347–27360. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/C9RA04848K>

YU, H. P.; LIU, F. C.; UMORO, A.; LIN, Z. C.; ELZOGHBY, A. O.; HWANG, T. L.; FANG, J. Y. Oleic acid-based nanosystems for mitigating acute respiratory distress syndrome in mice through neutrophil suppression: how the particulate size affects therapeutic efficiency. ***Journal of Nanobiotechnology***, v. 18, p. 25, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12951-020-0583-y>.

ZACK, K. M.; SORENSON, T.; JOSHI, S. G. Types and Mechanisms of Efflux Pump Systems and the Potential of Efflux Pump Inhibitors in the Restoration of Antimicrobial Susceptibility, with a Special Reference to *Acinetobacter baumannii*. ***Pathogens***, v. 13, p. 197, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pathogens13030197>

ZHANG, L.; TIAN, X.; SUN, L.; MI, K.; WANG, R.; GONG, F.; HUANG, L. Bacterial Efflux Pump Inhibitors Reduce Antibiotic Resistance. ***Pharmaceutics***, v. 16, p. 170, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16020170>

ZHANG, S.; WANG, J.; AHN, J. Advances in the Discovery of Efflux Pump Inhibitors as Novel Potentiators to Control Antimicrobial-Resistant Pathogens. ***Antibiotics***, v. 12, p. 1417, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antibiotics12091417>

