



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA (RENORBIO)

JORGE EDERSON GONÇALVES SANTANA

**ANÁLISE COMPARATIVA DE SESQUITERPENOS ISOLADOS E EM
NANOFORMULAÇÃO LIPOSSOMAL NA INIBIÇÃO DE SISTEMAS
BACTERIAIS DE EFLUXO SOBRE CEPAS DE *Staphylococcus aureus***

RECIFE - PE

2024

JORGE EDERSON GONÇALVES SANTANA

**ANÁLISE COMPARATIVA DE SESQUITERPENOS ISOLADOS E EM
NANOFORMULAÇÃO LIPOSSOMAL NA INIBIÇÃO DE SISTEMAS
BACTERIANOS DE EFLUXO SOBRE CEPAS DE *Staphylococcus aureus***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), nucleadora Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Teresinha Gonçalves da Silva

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Cícera Datiane de Moraes Oliveira Tintino

**RECIFE – PE
2024**

FICHA CATALOGRÁFICA

Catálogo de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Santana, Jorge Ederson Gonçalves.

Análise comparativa de sesquiterpenos isolados e em nanoformulação lipossomal na inibição de sistemas bacterianos de efluxo sobre cepas de *Staphylococcus aureus* / Jorge Ederson Gonçalves Santana. - Recife, 2024.

115p.: il.

Tese (doutorado) Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - Renorbio (Rede).

Orientação: Teresinha Gonçalves da Silva.

Coorientação: Cicera Datiane de Moraes Oliveira Tintino.

Inclui Referências.

1. Bomba de efluxo; 2. Lipossoma; 3. Resistência bacteriana; 4. Sesquiterpenos; 5. *Staphylococcus aureus*. I. Silva, Teresinha Gonçalves da - Orientadora. II. Tintino, Cicera Datiane de Moraes Oliveira - Coorientadora. III. Título.

UFPE-Biblioteca Central

CDD 660.6

JORGE EDERSON GONÇALVES SANTANA

**ANÁLISE COMPARATIVA DE SESQUITERPENOS ISOLADOS E EM
NANOFORMULAÇÃO LIPOSSOMAL NA INIBIÇÃO DE SISTEMAS
BACTERIANOS DE EFLUXO SOBRE CEPAS DE *Staphylococcus aureus***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), nucleadora Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), como requisito para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Aprovada em: 26/06/2024.

Banca examinadora

Prof.^a Dr.^a Teresinha Gonçalves da Silva
Orientadora – Renorbio/UFPE

Prof.^a Dr.^a Cicera Datiane de Moraes Oliveira Tintino
Coorientadora – URCA

Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes
Membro interno – Renorbio/URCA

Prof.^a Dr.^a Camila Fonseca Bezerra
Membro Externo – URCA

Prof. Dr. Saulo Relison Tintino
Membro Externo – URCA

Prof.^a Dr.^a Jacqueline Cosmo Andrade Pinheiro
Suplente – UFCA

Prof. Dr. Henrique Douglas de Melo Coutinho
Suplente – URCA

**RECIFE – PE
2024**

**Dedico este trabalho à minha esposa
Maitê Magela e aos meus filhos João
Pedro e Loianny Maely, que estiveram
comigo nesta árdua batalha.**

Agradecimentos

O sonho do doutorado finalmente se torna realidade. Foram muitas noites e dias árduos em busca deste belo título. Cada minuto valeu à pena, pois saio fortalecido. Portanto, agradeço:

Primeiramente, à Deus pelo dom da vida e pelas bênçãos derramadas sobre mim e minha família. Obrigado, meu Senhor, pois sem Ti eu não seria nada e não teria forças suficientes para enfrentar todas as adversidades da vida.

À minha esposa e filhos pelo apoio dado na busca de meus objetivos. Maitê Magela, meu grande amor e amiga de todas as horas, obrigado pelos lindos filhos e pelo lar acolhedor que você me proporciona. Meus amados filhos, João Pedro e Loianny Maely, vocês são a principal razão da minha busca por melhorias profissionais e pessoais. Tudo que faço é pensando em vocês e isso dá muito sentido à minha existência. O papai ama vocês demais e sempre fará tudo para que sejam felizes.

A meus pais, Esmeralda Gonçalves Santana e Cicero Rodrigues Santana (IN MEMORIAN) por todos os ensinamentos que me proporcionaram durante a vida. Mãe, obrigado por ser essa mulher guerreira e forte, que manteve eu e meus irmãos no caminho da honestidade. Pai, onde o senhor estiver sei que está feliz com mais essa vitória. Lembro que tinha muito orgulho de ter formado seus filhos na cabine de um caminhão. O senhor é minha grande inspiração de pai e homem.

Meus irmãos queridos, Eberson Santana e Eloyse Santana, obrigado pelo companheirismo e lealdade durante nossa formação como seres humanos. Aos meus sobrinhos Jorge Eberson (Jorginho), Guilherme e Isaac por acrescentarem felicidades à nossa família.

Agradeço imensamente à minha orientadora, Professora Dra. Teresinha Gonçalves da Silva, por me confiar a missão de fazer parte de um dos melhores doutorados do Brasil. Minha co-orientadora Dra. Cícera Datiane de Moraes Oliveira Tintino por me acolher de forma amigável no ambiente do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM). Ao coordenador e chefe do LMBM, o Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho (HD). Obrigado HD por ser amigo e companheiro, o senhor é a minha maior referência de profissionalismo e ética em pesquisa.

Enfim, agradeço a todos os amigos e familiares que estando próximos ou distantes, acabaram contribuindo carinhosamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

A resistência bacteriana aos antibióticos tem sido um dos maiores obstáculos para o sucesso na terapia antimicrobiana convencional. As bactérias desenvolveram, ao longo do tempo, mecanismos capazes de reduzir ou inibir a atividade terapêutica antibacteriana através dos sistemas de efluxo ativos. As bombas de efluxo estão presentes em espécies de bactérias, tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas e são capazes de extrusar antibióticos. Estudos já demonstraram que alguns compostos de origem natural como os sesquiterpenos têm atividade inibidora de bombas de efluxo em cepas resistentes de *Staphylococcus aureus*. O objetivo da pesquisa foi analisar a ação antibacteriana e inibidora de bombas de efluxo por lipossomas encapsulando os sesquiterpenos nerolidol, farnesol, α -bisabolol, trans-cariofileno e óxido de cariofileno, através de ensaios *in vitro* contra bactérias de *S. aureus* portadoras de bombas de efluxo. A atividade antibacteriana direta foi avaliada pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de cada sesquiterpeno e das suas respectivas formulações lipossomais. Foram utilizadas as cepas de *S. aureus* 1199B, IS-58, RN4220 e K2068, portadoras das bombas de efluxo NorA, Tet(K), MsrA e MepA respectivamente. Os ensaios ocorreram através de microdiluição em caldo e a leitura realizada pela adição de resazurina. A avaliação da inibição de bombas de efluxo foi avaliada pelo método de microdiluição seriada em caldo, associando-se as substâncias testes aos antibióticos e ao brometo de etídio. A redução das CIMs do antibiótico e do brometo indicou inibição da resistência bacteriana. Para cada cepa utilizou-se um antibiótico específico substrato da bomba de efluxo de cada bactéria. Para 1199B utilizou-se o antibiótico norfloxacin; para IS-58 utilizou-se tetraciclina; em RN4220 aplicou-se eritromicina. A inibição de bombas de efluxo também foi avaliada pela medição de emissão de fluorescência do brometo de etídio, onde um aumento da intensidade fluorescência indicou inibição do e aprisionamento do brometo de etídio. Quando isolado, o nerolidol exibiu atividade antibacteriana direta contra as cepas IS-58 e RN4220, apresentando uma CIM de 32 $\mu\text{g/mL}$ e 128 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. O farnesol, α -bisabolol e óxido de cariofileno isolados apresentaram atividade antibacteriana direta contra *S. aureus* 1199B, IS-58 e RN4220 com CIMs variando entre 16 $\mu\text{g/mL}$ a 512 $\mu\text{g/mL}$. Contudo as nanoformulações lipossomais não apresentaram atividade antibacteriana direta com uma CIM de $> 1024\mu\text{g/mL}$. Em termos de inibição da bomba de efluxo, o lipossoma/farnesol, lipossoma/ α -bisabolol e lipossoma/óxido de cariofileno atuaram como potenciais inibidores da NorA presente em *S. aureus* 1199B, reduzindo a CIM do brometo de etídio. Lipossoma/nerolidol e lipossoma/farnesol atuaram como potenciais inibidores de MsrA na cepa de *S. aureus* RN4220, reduzindo a CIM do brometo de etídio. Os sesquiterpenos isolados apresentaram ação significativa: o nerolidol, farnesol, trans-cariofileno e óxido de cariofileno atuaram como possíveis inibidores de NorA e MepA; O α -bisabolol, trans-cariofileno e óxido de cariofileno atuaram como possíveis inibidores de Tet(K), e o farnesol, trans-cariofileno e óxido de cariofileno isolados atuaram como inibidor de MsrA e MepA. Dentre todas as substâncias testadas, o nerolidol, trans-cariofileno e óxido de cariofileno isolados destacaram-se pela potente inibição da NorA. No entanto, são necessários para descrever os alvos moleculares envolvidos nestes mecanismos.

Palavras-Chave: Bomba de efluxo; Lipossoma; Resistência bacteriana; Sesquiterpenos *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

Bacterial resistance to antibiotics has been one of the major obstacles to success in conventional antimicrobial therapy. Over time, bacteria have developed mechanisms capable of reducing or inhibiting the therapeutic activity of antimicrobials through active efflux systems. Efflux pumps are present in various bacterial species, both Gram-positive and Gram-negative, and can extrude antibiotics from various classes. Several studies have demonstrated that certain natural compounds, such as sesquiterpenes, have efflux pump inhibitory activity in resistant strains of *Staphylococcus aureus*. This study aims to analyze the antibacterial and efflux pump inhibitory action of liposomes encapsulating sesquiterpenes nerolidol, farnesol, α -bisabolol, trans-caryophyllene, and caryophyllene oxide. The evaluation was conducted through in vitro tests against *S. aureus* bacteria carrying efflux pumps. Direct antibacterial activity was assessed by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) of each sesquiterpene and its respective liposomal formulations. Strains of *S. aureus* 1199B, IS-58, RN4220, and K2068, carrying the efflux pumps NorA, Tet(K), MsrA, and MepA, respectively, were used. Tests were conducted through broth microdilution, and readings were performed by adding resazurin. The evaluation of efflux pump inhibition was assessed by the serial broth microdilution method, combining test substances with antibiotics and ethidium bromide. Reduction in MIC of the antibiotic and bromide indicated inhibition of bacterial resistance. Specific antibiotics that are substrates for the efflux pump of each bacterium were used for each strain: norfloxacin for 1199B, tetracycline for IS-58, and erythromycin for RN4220. Efflux pump inhibition was also assessed by measuring the fluorescence emission of ethidium bromide, where an increase in fluorescence intensity indicated inhibition and trapping of ethidium bromide. When isolated, nerolidol exhibited direct antibacterial activity against IS-58 and RN4220 strains, with MICs of 32 $\mu\text{g/mL}$ and 128 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Farnesol, α -bisabolol, and caryophyllene oxide isolated showed direct antibacterial activity against *S. aureus* 1199B, IS-58, and RN4220 with MICs ranging from 16 $\mu\text{g/mL}$ to 512 $\mu\text{g/mL}$. However, liposomal nanoformulations did not exhibit direct antibacterial activity with an MIC of $> 1024 \mu\text{g/mL}$. In terms of efflux pump inhibition, liposome/farnesol, liposome/ α -bisabolol, and liposome/caryophyllene oxide acted as potential inhibitors of NorA in *S. aureus* 1199B, reducing the MIC of ethidium bromide. Liposome/nerolidol and liposome/farnesol acted as potential inhibitors of MsrA in the strain of *S. aureus* RN4220, reducing the MIC of ethidium bromide. The isolated sesquiterpenes showed significant action: nerolidol, farnesol, trans-caryophyllene, and caryophyllene oxide acted as potential inhibitors of NorA and MepA; α -bisabolol, trans-caryophyllene, and caryophyllene oxide acted as potential inhibitors of Tet(K), and farnesol, trans-caryophyllene, and caryophyllene oxide isolated acted as inhibitors of MsrA and MepA. Among all the substances tested, nerolidol, trans-caryophyllene, and caryophyllene oxide isolated stood out for their potent inhibition of NorA, showing action even more effective or equivalent to CCCP. Further studies are needed to describe the molecular targets involved in these mechanisms.

Keywords: Bacterial resistance; Efflux pump; Liposome; Sesquiterpenes; *Staphylococcus aureus*.

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1. Esquema ilustrativo da parede celular das bactérias Gram-positivas	21
Figura 2. Formação de biofilme de <i>Staphylococcus aureus</i> em uma superfície abiótica ...	23
Figura 3. Esquema ilustrativo dos sistemas proteicos de bombas de efluxo bacterianas	27
Figura 4. Estrutura transmembrana da superfamília MFS	28
Figura 5. Estrutura transmembrana da superfamília SMR	29
Figura 6. Estrutura transmembrana da superfamília RND	30
Figura 7. Domínios transmembrana dos sistemas de efluxo da superfamília ABC	31
Figura 8. Estrutura tridimensional transmembrana da superfamília PACE	32
Figura 9. Estrutura química <i>cis</i> (Z) e/ou <i>trans</i> (E) do nerolidol	39
Figura 10. Estrutura química do 2- <i>cis</i> -6- <i>cis</i> -farnesol	39
Figura 11. Estrutura química do α -bisabolol	40
Figura 12. Estrutura química do trans-cariofileno (A) e óxido de cariofileno (B)	42
Figura 13. Classificação estrutural dos lipossomas	44
Figura 14. Estrutura do lipossoma transportador de fármacos	45

Capítulo 1. Artigo original

Comparative Antibacterial and Efflux Pump Inhibitory Activity of Isolated Nerolidol, Farnesol, and α -Bisabolol Sesquiterpenes and Their Liposomal Nanoformulations

Figure 1. Evaluation of the NorA efflux pump inhibitory activity by nerolidol, farnesol and α -bisabolol sesquiterpenes isolated and encapsulated in liposomes, against the <i>S. aureus</i> 1199B strains.....	62
Figure 2. Evaluation of the Tet(K) efflux pump inhibitory activity by the nerolidol, farnesol, and α -bisabolol sesquiterpenes isolated and encapsulated in liposomes, against the <i>S. aureus</i> IS-58 strain	64

Figure 3. Evaluation of the MsrA efflux pump inhibitory activity by the nerolidol, farnesol, and α -bisabolol sesquiterpenes isolated and encapsulated in liposomes, against the <i>S. aureus</i> RN4220 strain	67
Figure 4. Evaluation of MepA efflux pump inhibition by measuring fluorescence emission in <i>S. aureus</i> K2068 strain, treated with nerolidol, farnesol, and α -bisabolol 100 μ g/ml	69

Capítulo 2. Artigo original

Inhibitory activity of NorA, Tet(K), MsrA, and MepA efflux pumps by the sesquiterpenes trans-caryophyllene and caryophyllene oxide isolated and in liposomal nanoformulation

Figure 1. Chemical structures of trans-caryophyllene and caryophyllene oxide	82
Figure 2. Inhibitory action of the NorA efflux pump by trans-caryophyllene and caryophyllene oxide, either isolated or encapsulated in liposomes, against the <i>S. aureus</i> 1199B strain. Associated with norfloxacin (A) and ethidium bromide (B)	88
Figure 3. Inhibitory action of the Tet(K) efflux pump by trans-caryophyllene and caryophyllene oxide, either isolated or encapsulated in liposomes, against the <i>S. aureus</i> IS-58 strain. Associated with tetracycline (A) and ethidium bromide (B)	89
Figure 4. Inhibitory action of the MsrA efflux pump by trans-caryophyllene and caryophyllene oxide, either isolated or encapsulated in liposomes, against the <i>S. aureus</i> RN4220 strain. Associated with erythromycine (A) and ethidium bromide (B).	91
Figure 5. Evaluation of fluorescence emission and inhibition of the MepA efflux pump treated with trans-caryophyllene and caryophyllene oxide, against the <i>S. aureus</i> K2068 ..	92

LISTA DE TABELAS

METODOLOGIA

Tabela 1. Cepas bacterianas de <i>S. aureus</i> utilizadas nos ensaios microbiológicos	51
---	----

Capítulo 1. Artigo original

Comparative Antibacterial and Efflux Pump Inhibitory Activity of Isolated Nerolidol, Farnesol, and α -Bisabolol Sesquiterpenes and Their Liposomal Nanoformulations

Table 1. Physical-chemical characteristics of liposomal nanoformulations control and containing nerolidol, farnesol, and α -bisabolol.....	58
Table 2. The minimum inhibitory concentration of isolated and encapsulated nerolidol, farnesol, and α -bisabolol against <i>S. aureus</i> strains 1199B, IS-58, and RN4220. Concentrations in (μ g/mL).....	60
Table 3. Minimum inhibitory concentration of nerolidol, farnesol, and α -bisabolol sesquiterpenes, whether isolated or encapsulated in liposomes, against the <i>S. aureus</i> 1199B strain, associated with norfloxacin and ethidium bromide. * Statistically significant compared to the norfloxacin or EtBr control	63
Table 4. Minimum inhibitory concentration of nerolidol, farnesol, and α -bisabolol sesquiterpenes, whether isolated or encapsulated in liposomes, against the <i>S. aureus</i> IS-58 strain, associated with norfloxacin and ethidium bromide. * Statistically significant compared to the tetracyclin or EtBr control.....	65
Table 5. Minimum inhibitory concentration of nerolidol, farnesol, and α -bisabolol sesquiterpenes, whether isolated or encapsulated in liposomes, against the <i>S. aureus</i> RN4220 strain, associated with norfloxacin and ethidium bromide. * Statistically significant compared to the tetracyclin or EtBr control.....	67
Table 6. Bacterial strains of <i>S. aureus</i> used in the microbiological assays.....	71

Capítulo 2. Artigo original

Inhibitory activity of NorA, Tet(K), MsrA, and MepA efflux pumps by the sesquiterpenes trans-caryophyllene and caryophyllene oxide isolated and in liposomal nanoformulation

Table 1. Physicochemical characteristics of the liposomal nanoformulations containing trans-caryophyllene and caryophyllene oxide 86

Table 2. Evaluation of the in vitro antibacterial activity of the sesquiterpenes trans-caryophyllene, caryophyllene oxide, and the liposomal nanoformulations containing trans-caryophyllene and caryophyllene oxide 87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	<i>Adenosine Binding Cassete</i>
ADAM	Domínio metalloproteinase 10
ANOVA	Análise de variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CCCP	<i>Carbonyl cyanide m-chlorophenyl-hydrazone</i>
UFCs	Unidades Formadoras de Colônias
CHOL	<i>Cholesterol</i>
DMSO	<i>dimethyl sulfoxide</i>
DPPC	<i>1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine</i>
DSPC	<i>Distearoylphosphatidylcholine</i>
SPE	substância polimérica extracelular
EtBr	Brometo de Etídio
HIA	<i>Heart Infusion Agar</i>
IOs	Infecções oportunistas
MATE	<i>Multidrug and Toxic Compound Extrusion</i>
MDR	<i>Multiresistant drug</i>
MFS	<i>Major Facilitator Superfamily</i>
MIC	<i>minimum inhibitory concentration</i>
MRSA	<i>Meticilin resistance Staphylococcus aureus</i>
MSF	Modulinas solúveis em fenol
MWCO	<i>Molecular weight cutoff</i>
Nfl	Nanoformulação lipossomal
PBPs	<i>proten blood penicilina</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PDI	<i>polydispersity index</i>
PEG	Polietienoglicol
pH	potencial hidrogeniônico
PIA	<i>Polysaccharide intracellular adenosine</i>
PNAG	<i>poli-N-acetil glucosamine</i>
PPE	<i>personal protective equipment</i>

RND	<i>Resistance-nodulation-cell-division</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcription - polymerase chain reaction</i>
SMR	<i>Small Multidrug Resistance</i>
USA	<i>United States of America</i>
VRSA	<i>Vancomycin resistance Staphylococcus aureus</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos Específicos	20
3 REFERENCIAL TEÓRICO	21
3.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	21
3.1.1 Fontes de Infecções por <i>S. aureus</i>	22
3.1.2 Fatores de virulência.....	24
3.1.2.1 Mecanismos de evasão imunológica de <i>Staphylococcus aureus</i>	24
3.1.1.2 Fatores de adesão.....	24
3.2 Multirresistência bacteriana a antibióticos	25
3.3 Bombas de efluxo	26
3.4 Sistemas proteicos de bombas de efluxo	27
3.4.1 Superfamília MFS (<i>Major facilitator superfamily</i>).....	27
3.4.2 Superfamília SMR (<i>Small multidrug resistance</i>)	29
3.4.3 Superfamília MATE (<i>Multidrug and toxic compound extrusion</i>).....	29
3.4.4 Superfamília RND (<i>Resistance-nodulation-cell division</i>).....	30
3.4.5 Superfamília ABC (<i>ATP-binding cassette</i>)	31
3.4.6 Superfamília PACE (<i>Proteobacterial antimicrobial compound efflux</i>).....	32
3.5 Bombas de efluxo específicas.....	33
3.5.1 Bomba de efluxo NorA	33
3.5.2 Bomba de efluxo Tet(K).....	33
3.5.3 Bomba de efluxo MsrA	34
3.5.4 Bomba de efluxo MepA	34
3.6 Inibidores de bomba de efluxo	35
3.6.1 Classificação dos inibidores de bombas de efluxo	35
<i>Desacopladores de energia das bombas de efluxo</i>	35
<i>Inibidores de ligação direta das bombas de efluxo</i>	36
<i>Inibidores peptidomiméticos</i>	36
<i>Inibidores de efluxo de células eucarióticas</i>	36
<i>Oligonucleotídeos antimensageiros e anticorpos</i>	37
<i>Análogos de antibióticos</i>	37
3.7 Alcaloides terpênicos.....	37
3.7.2 Sesquiterpenos	37
<i>Nerolidol</i>	38
<i>Farnesol</i>	39
<i>α-bisabolol</i>	40
<i>Trans-cariofileno e óxido de cariofileno</i>	41
3.7 Nanotecnologia e suas aplicações na saúde.....	42
3.7.1 Lipossomas	42
<i>Lipossomas convencionais</i>	44
<i>Lipossomas de longa circulação</i>	45
<i>Lipossomas sítio-específicos</i>	45
<i>Imunolipossomas</i>	46
<i>Lipossomas como carreadores de proteínas e peptídeos</i>	46
<i>Virossomas</i>	46
<i>Lipossomas polimórficos</i>	46
3.7.2 Perfil físico-químico dos lipossomas.....	47
<i>Tamanho médio das partículas</i>	47

<i>Intensidade</i>	47
<i>Potencial Zeta</i>	47
<i>Concentração dos lipossomas</i>	48
<i>Índice de polidispersão (IDP)</i>	48
<i>Eficiência de encapsulamento</i>	49
4 METODOLOGIA	50
4.1 Substâncias utilizadas em pesquisa	50
4.3 Síntese de nanoformulações lipossomais	50
4.4 Microrganismos utilizados nos ensaios	51
4.5 Atividade antibacteriana avaliada medindo a Concentração Inibitória Mínima (CIM)	51
4.6 Avaliação da inibição das bombas de efluxo NorA, Tet(K), MsrA e MepA	52
4.7 Inibição de bombas de efluxo avaliada pelo aumento da emissão de fluorescência de EtBr	52
4.8 Análise estatística	53
5 CAPÍTULO 1: ARTIGO ORIGINAL	54
Comparative Antibacterial and Efflux Pump Inhibitory Activity of Isolated Nerolidol, Farnesol, and α-Bisabolol Sesquiterpenes and Their Liposomal Nanoformulations	54
5.1 Introduction	56
5.2 Results and Discussion	57
5.2.1. Physical-Chemical Profile of Liposomes	57
5.2.2 Antibacterial Activity and Efflux Pump Inhibition Assessed through MIC Reduction	60
5.2.3 Evaluation of Efflux Pump Inhibition by Fluorescence Emission	69
5.3 Materials and Methods	70
5.3.1 Substances Used in Research	70
5.3.2 Synthesis of Liposomal Nanoformulations	70
5.3.3 Microorganisms Used in the Assays	71
5.3.4 Antibacterial Activity Evaluated by Measuring the Minimum Inhibitory Concentration (MIC)	71
5.3.5 Evaluation of the Inhibition of Efflux Pumps NorA, Tet(K), and MsrA	72
5.3.6 Efflux Pumps Inhibition Evaluated by the Increased Fluorescence Emission of EtBr	72
5.3.7 Statistical Analysis	73
5.4 Conclusions	73
References	74
6 CAPÍTULO 2: ARTIGO ORIGINAL	80
Liposomal nanoformulations with trans-caryophyllene and caryophyllene oxide: do they have an inhibitory action on the efflux pumps NorA, Tet(K), MsrA, and MepA?	80
6.1 Introduction	81
6.2 Materials and Methods	83
6.2.1 Substances used in the synthesis of liposomes	83
6.2.2 Substances used in microbiological tests	83
6.2.3 Synthesis of liposomes	83
6.2.4 Bacterial strains	84
6.2.5 Evaluation of the direct antibacterial activity of sesquiterpenes and nanoformulations	84
6.2.6 Evaluation of efflux pump inhibitory activity by MIC reduction	84
6.2.7 Evaluation of efflux pump inhibition through the measurement of EtBr fluorescence emission	85
6.2.8 Statistical analysis	85
6.3 Results	86

6.3.1 Physical-chemical profile of liposomes.....	86
6.3.3 Evaluation of efflux pump inhibitory activity by MIC reduction	87
6.4 Discussion	92
6.5 Conclusion	94
7 DISCUSSÃO GERAL	101
8 CONCLUSÃO.....	104
REFERÊNCIAS	105

1 INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana a antibióticos tem sido um dos maiores obstáculos para o sucesso na terapêutica antimicrobiana convencional. As bactérias desenvolveram, ao longo dos tempos, mecanismos capazes de reduzir ou inibir a atividade terapêutica dos fármacos antimicrobianos. Dentre os mecanismos de resistência aos antibióticos, pode-se destacar: a redução da concentração do antibiótico no interior da célula devido à existência de sistemas de efluxo ativos (sistemas *MDR*), alteração do alvo do antibiótico por mutação espontânea e/ou por alteração estrutural, através de sistemas de inativação enzimática (por exemplo, bactérias produtoras de beta-lactamase) e alterações de permeabilidade da membrana plasmática (Luo *et al.*, 2024).

Em sua grande maioria, a resistência aos antibióticos consiste em um fenômeno natural e do caráter evolutivo e adaptativo das bactérias. Porém, o comportamento humano tem sido decisivo para os níveis alarmantes de multirresistência alcançados, onde o principal fator diz respeito ao uso abusivo e indiscriminado de antibacterianos, muitas vezes sem nenhuma necessidade (González-Bello, 2017).

Para bloquear os mecanismos de resistência das bactérias muitas pesquisas têm mostrado a aplicabilidade de plantas que apresentem atividade antibacteriana comprovada ou substâncias naturais com elevado potencial de inibir as infecções por bactérias. As plantas medicinais nativas da flora brasileira têm se apresentado como uma fonte promissora de princípios ativos com atividade antimicrobiana (Oliveira *et al.*, 2006; Almeida *et al.*, 2013). Estes produtos naturais têm sido amplamente utilizados em associação com fármacos convencionais no tratamento de diversas patologias, especialmente aquelas causadas por microrganismos. Dentre eles, destacam-se os óleos essenciais presentes nos produtos vegetais, que são misturas orgânicas de compostos hidrofóbicos, tais como sesquiterpenos, monoterpenos e fenilpropanoides (Probst, 2012).

Os sesquiterpenos (farnesol, nerolidol, α -bisabolol, cariofileno e trans-cariofileno) e monoterpenos (geraniol, mentol, linalol e o citral) são constituintes voláteis extraídos de plantas medicinais e ervas aromáticas com atividades antimicrobianas e anti-herbivoria. Esses ativos podem apresentar, além de atividade antibacteriana direta, uma significativa atividade inibidora da resistência aos antibióticos, aumentando a eficácia destes fármacos contra bactérias multirresistentes (Diaz *et al.*, 2010; Pinto *et al.*, 2013). Os sesquiterpenos constituem uma classe de terpenoides estruturalmente variada com importante papel na composição de óleos essenciais, sendo sintetizados pela condensação de unidades pentacarbonadas, o

difosfato de isopentenila e seu isômero difosfato de dimetilalila, conferindo características lipossolúveis (Aharoni *et al.*, 2006; Homem, 2015).

Nesse sentido, a aplicabilidade dos compostos terpenoides encontra dificuldade de transporte através do plasma sanguíneo. Diante disso, nos últimos tempos, muitos estudos têm testado o uso de tecnologias capazes de facilitar esse processo, tais como o nanoencapsulamento lipossomal. A utilização de nanoformulações lipossomais facilita a aplicação e o transporte de substância de baixa solubilidade no plasma (Rodríguez *et al.*, 2016).

Os lipossomas são vesículas esféricas formadas de bicamadas fosfolipídicas concêntricas que espontaneamente se formam em solução aquosa. Esta membrana de bicamada lipídica envolve um núcleo aquoso onde drogas hidrofílicas podem ser encapsuladas, enquanto drogas lipofílicas podem ser aprisionadas na membrana. Sua similaridade com membranas biológicas permite que seus conteúdos tenham maior interação com as células, favorecendo a endocitose e que sejam utilizadas doses menores do fármaco, diminuindo o risco de efeitos adversos e a bioacumulação no sítio alvo (Chorilli *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2016; Camilo *et al.*, 2020).

Este trabalho objetiva a análise da ação antibacteriana e inibitória de bombas de efluxo por lipossomas, encapsulando sesquiterpenos nerolidol, farnesol, α -bisabolol, trans-cariofileno e óxido de cariofileno, avaliados através de testes *in vitro*, frente as bactérias resistentes de *Staphylococcus aureus* 1199B, IS-58, RN4220 e K2068. Pretende-se também traçar um comparativo entre o efeito dos sesquiterpenos isolados e em formulação lipossomal, sobre a resistência aos antibióticos em linhagens de *S. aureus* portadoras de bombas de efluxo, avaliando as variações da concentração inibitória mínima.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Comparar o efeito potencializador da atividade antibiótica dos sesquiterpenos farnesol, nerolidol, α -bisabolol, trans-cariofileno e óxido de cariofileno na forma isolada e em nanoformulação lipossomal (NfL), visando redução da concentração inibitória mínima.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade antibacteriana intrínseca e associada a antibióticos dos sesquiterpenos contra linhagens MDR de *Staphylococcus aureus*.
- Verificar a capacidade dos sesquiterpenos em inibir o funcionamento de bombas de efluxo em linhagens de *S. aureus* portadoras desses mecanismos de resistência;
- Identificar a possibilidade de interações entre os sesquiterpenos isolados e em nanoformulações lipossomais (NfL) com as principais proteínas do sistema de efluxo ou com a membrana bacteriana por meio de análises *in silico*;
- Avaliar a inibição do sistema de efluxo por meio da redução da expressão gênica e da fluorescência do brometo de etídio em decorrência da interação com os sesquiterpenos isolados e em NfL;
- Avaliar o potencial inibidor do mecanismo de efluxo por meio de ensaios *in vitro*, *in silico* e de inibição da expressão gênica, visando a obtenção de um produto que melhore a eficácia de antibióticos já disponíveis no mercado.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 *Staphylococcus aureus*

O *Staphylococcus aureus* é uma das 33 espécies de bactérias gram-positivas que fazem parte da família Staphylococcaceae, que apresenta como principal característica o agrupamento em cachos de uvas, mas que também podem ser identificados na coloração de gram isolados, aos pares e em cadeias curtas (Gordon *et al.*, 2021).

Descrita em 1880, em abscessos cirúrgicos pelo cirurgião escocês Alexandre Ogston, a bactéria *S. aureus* é um microorganismo gram-positivo anaeróbico facultativo, capaz de crescer por fermentação ou respiração aeróbica, imóvel e não esporulado. Sua denominação é resultado da coloração amarela ou dourada que a colônia apresenta em meio de cultura (Tintino, 2021).

A parede celular do *S. aureus* é típica das bactérias Gram-positivas (Figura 1), com uma espessa camada de peptideoglicano (mureína) e moléculas antigênicas como os ácidos tecoicos e poliotecoicos, proteína A, adesinas e cápsula.

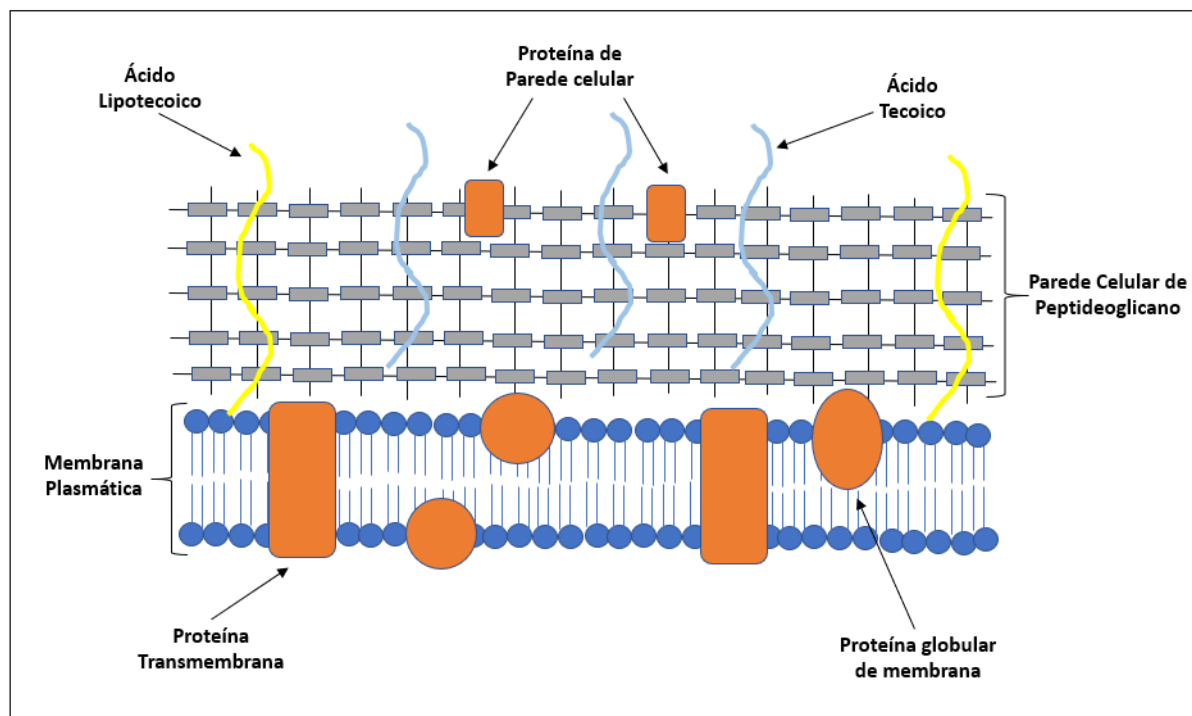


Figura 1. Esquema ilustrativo da parede celular das bactérias Gram-positivas.
Fonte: Elaborado pelo autor.

O *S. aureus* é a espécie de maior interesse médico, por ser a responsável por inúmeras infecções cutâneas e invasivas moderadas a graves tais como: furúnculos, abscessos e

infecções de feridas, infecções de trato respiratório, cirúrgicas, de próteses e cardiovasculares (endocardite) (Gordon *et al.*, 2021).

As infecções por *S. aureus* são consideradas de difícil tratamento, muitas vezes, devido à ocorrência frequente de resistência a antimicrobianos, como por exemplo, as cepas MRSA (*Meticilin resistance Staphylococcus aureus*) e VRSA (*Vancomycin resistance Staphylococcus aureus*) que provocam o aumento de morbi-mortalidade e tempo de internação hospitalar. Além disso, surge a resistência inespecífica aos antibióticos pela formação de biofilme em próteses articulares e todas as outras infecções associadas a dispositivos médicos, endocardite, osteomielite, conjuntivite e outras (Kourtis *et. al.*, 2019; Turner *et. al.*, 2019).

3.1.1 Fontes de Infecções por *S. aureus*

As infecções por *S. aureus* são originadas geralmente de colonização assintomática, onde as narinas são o principal local de contaminação, além da pele e do intestino. Esse patógeno produz infecção sistêmica a partir da ruptura da camada epitelial protetora, onde se inicia em pequenos arranhões e pode se tornar invasiva. A α -toxina pode provocar a ruptura epitelial por ativação da proteína 10, que contém o fator proteico ADAM-10 (domínio metaloproteinase) por dois mecanismos: (1) a formação de poros em uma série de células alvo através da formação de um poro heptamérico; (2) ruptura epitelial e endotelial através da ruptura das junções aderentes e do comprometimento do citoesqueleto (Bouiller, 2012; Senn *et al.*, 2016).

3.1.1.1 Formação de biofilmes

O *S. aureus* é considerado uma fonte frequente de infecção hospitalar, no qual é capaz de aderir-se ao material dos aparelhos médicos e formar biofilmes. Estes também podem se formar nas superfícies de tecidos, como em válvulas cardíacas (endocardite). De acordo com Idress *et al.* (2021), o biofilme é formado quando as células planctônicas flutuantes se fixam à superfície disponível e começam a colonizar. A adesão à superfície ocorre por ação de várias macromoléculas, originando microcolônias e a formação de uma substância polimérica extracelular (EPS), que por sua vez, desenvolve-se em um biofilme maduro (Petrova; Sauer, 2012; Krasowska; Sigler, 2014; Maikranz, *et al.*, 2022).

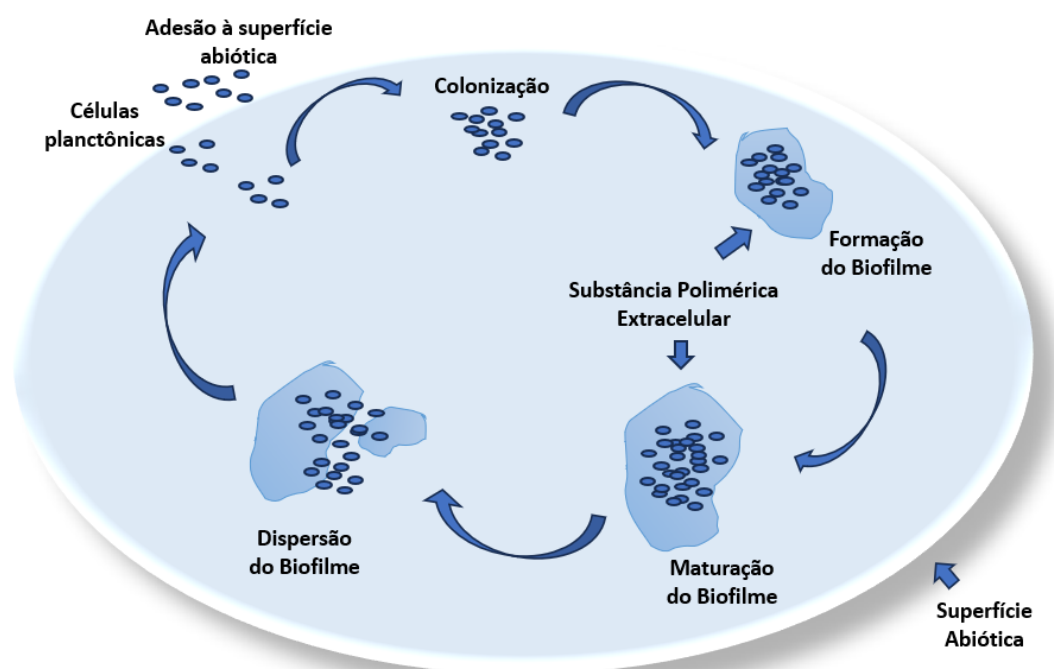


Figura 2. Formação de biofilme de *Staphylococcus aureus* em uma superfície abiótica
 Fonte: Elaborado pelo autor.

Segundo Gordon *et al.* (2021), o principal papel do biofilme é proteger as bactérias da fagocitose. Os biofilmes geralmente não são cercados por grandes camadas de neutrófilos como os abscessos, pois distorcem a resposta imune do hospedeiro em direção a um estado anti-inflamatório.

3.1.1.2 Infecções oportunistas por *Staphylococcus aureus*

As infecções oportunistas (IOs) são causadas por patógenos que se desenvolvem e desencadeiam doença devido à baixa imunidade do hospedeiro. O *S. aureus* se aproveita da debilidade do sistema imunológico, provocada por outros patógenos como, por exemplo, os vírus *Influenza A* e Sars-CoV-2. Nas infecções pulmonares virais, muitas vezes, o *S. aureus* se desenvolve como uma infecção secundária, sendo responsável pela piora no quadro clínico do paciente e até mesmo o óbito (Gordon *et al.*, 2021).

Estudos mostram que o *S. aureus* é responsável por aumentar o surgimento de infecções cutâneas atópicas, devido à ação das toxinas δ e/ou as modulinas solúveis em fenol (MSFs). As ulcerações cutâneas de Buruli (*Mycobacterium ulcerans*), por exemplo, podem ser exacerbadas mesmo após a erradicação do patógeno (Hodille, *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2017).

3.1.2 Fatores de virulência

O *S. aureus* produz vários fatores de virulência, incluindo várias toxinas e fatores de evasão imunológica, além de fatores proteicos e não proteicos que permitem a colonização do hospedeiro durante a infecção (Gordon *et al.*, 2021).

3.1.2.1 Mecanismos de evasão imunológica de *Staphylococcus aureus*

Os processos de eliminação pelos neutrófilos aumentam a virulência da bactéria através de diversos níveis, como: a inibição do crescimento/opsonização imune; agregação/produção de matriz; resistência a mecanismos bactericidas fagossômicos e a ação direta na eliminação de fagócitos e outras células do sistema imunológico (Gordon *et al.*, 2021).

Na inibição da opsonização, o *S. aureus* secreta uma infinidade de moléculas que ativam o sistema do complemento, que inibem a adesão dos neutrófilos ao endotélio vascular e seu extravasamento dos vasos sanguíneos aos tecidos infectados. Por sua vez, uma lipase produzida pelo patógeno é capaz de diminuir a ação da cascata pró-inflamatória e dos fatores de ativação de defesa (Berube; Bubeck, 2013; Alonzo; Torres 2014).

O *S. aureus* produz cápsula, exopolissacarídeos e biofilmes, proporcionando um aumento da virulência bacteriana por resistência à fagocitose. Além disso, o patógeno subverte eficientemente os mecanismos bactericidas de neutrófilos dependentes e independentes de oxigênio. Citolisinas, incluindo as leucocidinas bicomponentes, α -toxina e PSMs inibem a atuação direta dos fagócitos (Alonzo; Torres 2014).

A toxina α é a mais importante no processo de patogênese do *S. aureus* e possui múltiplas funções, como a violação tecidual, ativando uma série de eventos inflamatórios na célula-alvo e induzindo a lise e morte celular por piroptose (Ahmad-Mansour *et al.*, 2021).

3.1.1.2 Fatores de adesão

A adesão do *S. aureus* à pele e mucosas é bastante importante para que a bactéria possa invadir as células do hospedeiro e desenvolver-se no processo de infecção. Os principais fatores de adesão são os ácidos teicoicos e adesinas específicas, que são expressas na parede celular, interagindo com as células do hospedeiro (Zhang, *et al.*, 2017).

As adesinas bacterianas são proteínas de ligação ao fibrinogênio, à fibronectina e ao colágeno, sendo comuns na formação das cápsulas em casos de bacteremia. A adesina intracelular polissacarídica (PIA) também denominada poli-N-acetil glucosamina (PNAG) é um exopolissacarídeo homopolimérico, importante formadora de biofilmes em infecções por *S. aureus*. A PIA/PNAG protege a bactéria do ataque por fagócitos e contribui para a rede de formação dos biofilmes (Zhang *et al.*, 2017; Idress *et al.*, 2021).

3.2 Multirresistência bacteriana a antibióticos

A resistência desenvolvida pelas bactérias aos antimicrobianos convencionais representa um dos maiores desafios da medicina moderna, sendo responsável pela elevada morbimortalidade causada por infecções bacterianas. A multirresistência bacteriana resulta em infecções de difícil tratamento e, até mesmo, intratáveis através dos antibióticos convencionais (Frieri, 2016).

A resistência bacteriana a antibióticos vem crescendo de forma alarmante em todo o mundo, devido principalmente, ao uso indiscriminado desses fármacos. Os desafios no combate a infecções bacterianas e doenças associadas são significativos. Além disso, a disponibilidade de novos agentes terapêuticos eficazes tem sido cada vez menor (Mühlen, 2015).

Os mecanismos de resistência a antibióticos são responsáveis por um grande número de mortes em todo o mundo. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), por ano, cerca de 25 mil pessoas morrem na Europa e 23 mil nos Estados Unidos da América (EUA) decorrente de infecções com multirresistência bacteriana. Já no Brasil, não existem dados epidemiológicos suficientes sobre casos de infecções por bactérias resistentes, mas acredita-se em milhares de mortes por ano (WHO, 2014).

As bactérias tornam-se resistentes aos antibióticos por desenvolverem mecanismos capazes de impedir que o fármaco exerça sua ação farmacológica. Os principais mecanismos de resistências consistem em inativação enzimática do antibiótico, alteração do alvo do antibiótico pelas bactérias e modificações bacterianas que impedem chegada do antibiótico no ponto alvo.

No mecanismo de inativação enzimática do antibiótico as bactérias desenvolvem ações capazes de inativarem os fármacos, degradando-os. Nesse grupo, destacam-se as bactérias produtoras da enzima beta-lactamase, que inibem a ação do anel beta-lactâmico presente nas

penicilinas e seus derivados. Outro exemplo pode ser a produção de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (Daza-Pérez, 1998).

A alteração pelas bactérias de seu ponto-alvo leva às mutações no sítio alvo do antibiótico fazendo com que não haja reconhecimento do fármaco pelo seu sítio alvo ou através de metilações ou adição de outros grupos químicos, impedindo a ligação de antibióticos no alvo. Podem ocorrer mutações na DNA-girase conferindo resistência às quinolonas; mutações na porção 23S rRNA, conferindo resistência a macrolídeos; modificação das enzimas PBPs (proteínas de ligação à penicilina) necessárias para a formação da parede celular, com consequente resistência aos beta-lactâmicos (Daza-Pérez, 1998; Almeida, 2013).

As modificações bacterianas que impedem a chegada do antibiótico no sítio alvo consistem na impermeabilização da membrana por regulação negativa de porinas ou consistem na produção de sistemas de efluxo ativos, ou sistemas de efluxo de múltiplas drogas (MDR) também denominados bombas de efluxo (Daza-Pérez, 1998; Almeida, 2013).

3.3 Bombas de efluxo

As bombas de efluxo são consideradas um dos mais importantes mecanismos de resistência bacterianos, pois apresentam grande amplitude de ação, isto é, podem estar presentes nas mais variadas espécies de bactérias, tanto Gram-positivas, quanto Gram-negativas, mas há bombas de efluxos específicas para antibióticos específicos (Silva, 2017).

De acordo com Moreira *et al.* (2008), as bactérias tornam-se resistentes através de mutações ou recebem genes de resistência de outras bactérias pela transferência horizontal de genes, que codificam bombas de efluxo, enzimas que degradam antibióticos ou proteínas de proteção ribossomal. Os genes de resistência estão presentes principalmente em plasmídeos e transposons, podendo também estarem integradas ao genoma do cromossoma bacteriano.

Os sistemas de efluxo multidrogas (MDR) são compostos por proteínas transportadoras transmembranas que realizam funções fisiológicas importantes na bactéria como o transporte de nutrientes importantes, para o interior da célula. Em células procarióticas, a maioria dos sistemas de efluxo é realizada pelo transporte ativo secundário, com gasto de energia oriunda da força próton-motora, que funciona como transporte antiporte droga/próton. Mas algumas são transportadores primários, do tipo ATPásicas, como as da família ABC (Piddock, 2006; Moreira *et al.*, 2008).

De acordo com Silva (2017), as bactérias podem apresentar bombas de efluxo classificadas em seis famílias diferentes: 1) Superfamília “ATP-Binding Cassete” (ABC); 2) Superfamília “Major Facilitator” (MFS); 3) Família “Small Multidrug Resistance” (SMR); 4) Superfamília “Resistance-nodulation-cell-division” (RND), 5) Família “Multidrug and Toxic Compound Extrusion” (MATE) e 6) Família “Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux” (PACE) (Figura 3).

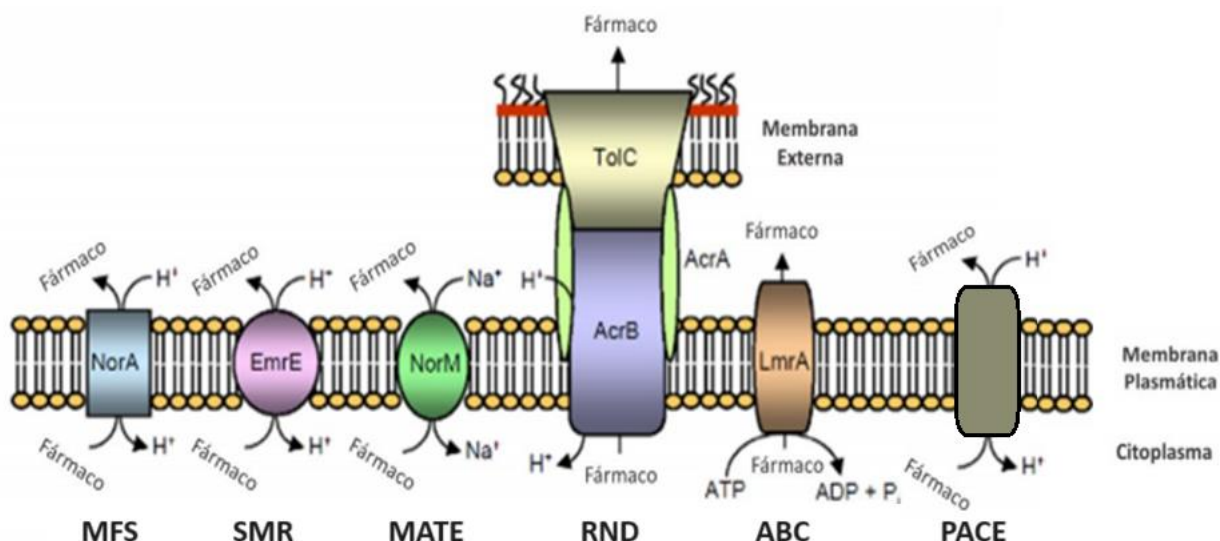


Figura 3. Esquema ilustrativo dos sistemas proteicos de bombas de efluxo bacterianas. NorA de *S. aureus*, (Superfamília MFS); EmrE de *Escherichia coli* (Superfamília SMR); NorM de *Vibrio parahaemolyticus* (Família MATE); AcrAB-TolC de *Escherichia coli* (Superfamília RND); LmrA de *Lactococcus lactis* (Superfamília ABC).

Fonte: Moreira *et. al.*, 2008 (modificado pelo autor).

3.4 Sistemas proteicos de bombas de efluxo

3.4.1 Superfamília MFS (*Major facilitator superfamily*)

A superfamília de facilitadores (MFS) é composta por proteínas que realizam mecanismo de extrusão simporte (substrato/H⁺), antiporte (substrato/H⁺) ou troca de um substrato por outro (substrato/substrato), onde o cátion pode ser um Na⁺ ou H⁺ (REDDY *et al.*, 2012). A superfamília MFS é constituída morfológicamente por dois domínios transmembranares (TMD), cada um composto por seis segmentos transmembranares (TMS), formando o poro hidrofílico (figura 4).

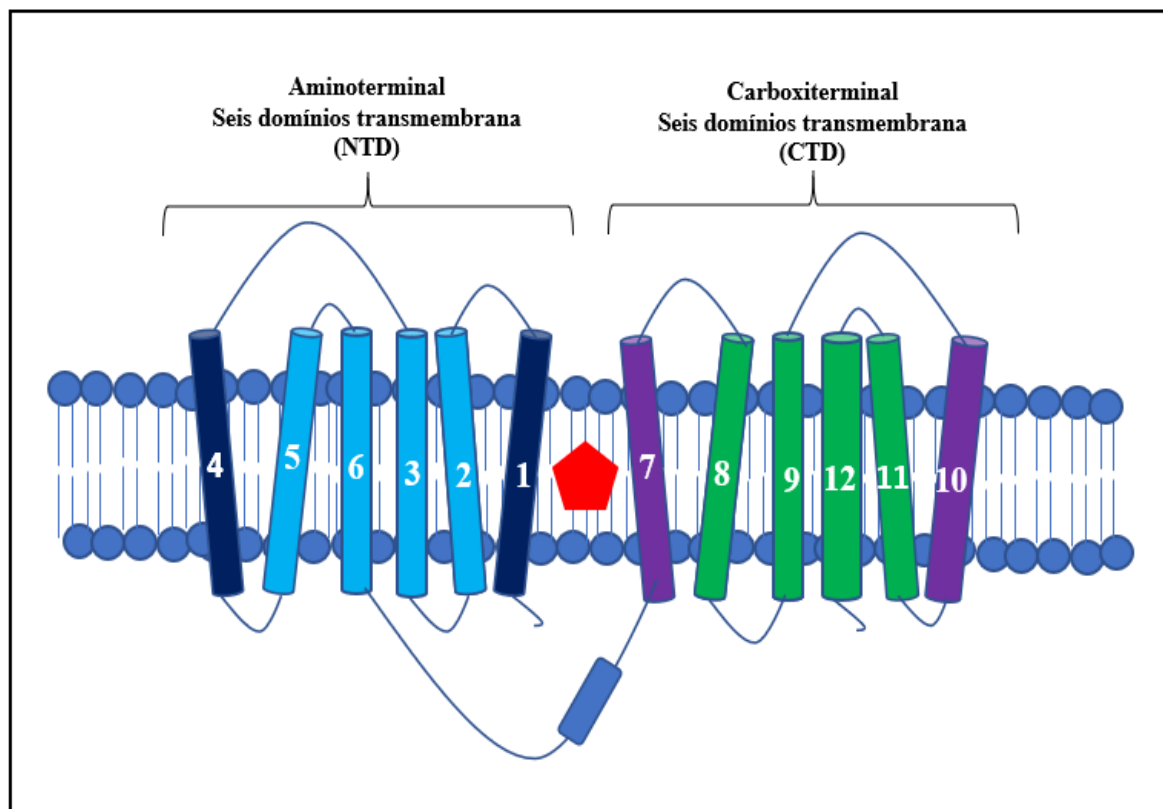


Figura 4. Estrutura transmembrana da superfamília MFS. Estão representados 12 segmentos transmembranares e os respectivos terminais carboxílico (C) e amínico (N), bem como a hansa hidrofílica citoplasmática (LC).

Fonte: Elaborado pelo autor.

As bombas de efluxo da superfamília MFS são mais comuns em bactérias Gram-positivas, mas também podendo ser encontradas em Gram-negativas. Os principais sistemas de efluxo que levam ao surgimento de resistência a antimicrobianos são codificados através de genes cromossômicos, resultando nas proteínas MFS da família Nor, como por exemplo as bombas NorA, NorB e NorC (Sun; Deng; Yan, 2014).

Os sistemas de efluxo da superfamília MFS são capazes de transportar diversos compostos tais como: carboidratos, produtos metabólicos, íons e antibióticos. Nas bactérias gram-positivas, como por exemplo, o *Staphylococcus aureus*, a proteína NorA está presente em algumas cepas de superbactérias, provocando resistência a antibióticos da classe das fluorquinolonas, especialmente o norfloxacin. Nas bactérias gram-negativas, tais como a *Escherichia coli*, ocorre efluxo de antibióticos devido à formação de um complexo proteico composto por proteínas de membrana externa (OMP), proteínas de membrana interna (IMP) e proteínas de fusão de membrana (MFPs) (Tintino, 2021).

3.4.2 Superfamília SMR (*Small multidrug resistance*)

A superfamília SMR é a menos numerosa, sendo composta apenas por quatro segmentos transmembranares em estruturas tetraméricas (figura 5).

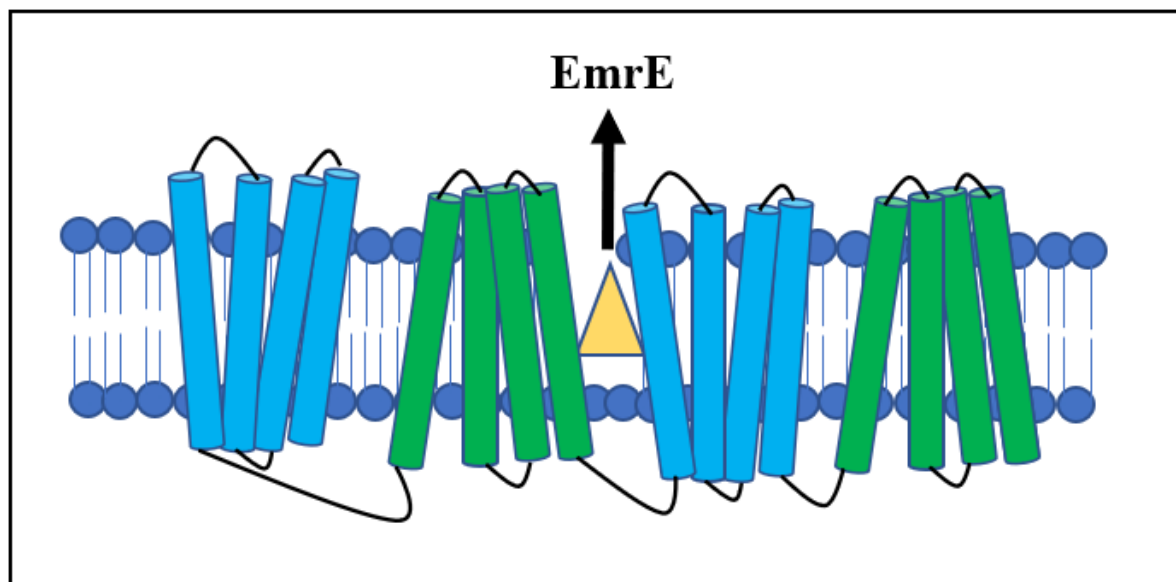


Figura 5. Estrutura transmembrana da superfamília SMR

Fonte: Elaborado pelo autor.

O processo de extrusão de drogas ocorre através da membrana por mecanismo energético de força próton-motriz (gradiente de H^+). A bomba de efluxo EmrE apresenta esse mecanismo de extrusão, sendo bastante comum em enterobactérias, tais como a *E. coli*. Nas Gram-positivas, destaca-se a bomba Smr de *S. aureus* (Tintino, 2021).

Essas bombas são reponsáveis por extrusar compostos lipofílicos, como quaternário de amônio, do inglês *quaternary ammonium compounds* (QACs), corantes intercalantes de DNA, drogas e outros metabólitos tóxicos às bactérias (Bay; Turner, 2009).

3.4.3 Superfamília MATE (*Multidrug and toxic compound extrusion*)

A superfamília MATE era anteriormente classificada como membro da superfamília MFS, devido às semelhanças entre suas características topológicas de membrana. No entanto, após estudos a MATE foi considerada uma classe específica, que contém 12 segmentos transmembranares, extrudando as moléculas através de mecanismo do tipo antiporte, por gradiente de Na^+ ou H^+ da membrana. Essa família apresenta mecanismo de efluxo de íons (cátions), corantes e antimicrobianos fluoroquinolônicos (Kuroda; Tsuchiya, 2009).

3.4.5 Superfamília ABC (*ATP-binding cassette*)

A superfamília de sistema de efluxo ABC (*ATP-Binding Cassete*) é o principal mecanismo de efluxo em células eucarióticas, mas que também se encontra em seres procariontes como as bactérias. Elas obtêm a energia de hidrólise de ATP para mover diversos compostos através da membrana (Morales-Pérez; Garcia-Mílian, 2017)

O sistema ABC consiste em uma bomba composta por dois domínios de partes integrantes atravessando a membrana 6 vezes cada e dois domínios hidrolisantes de ATP (figura 7).

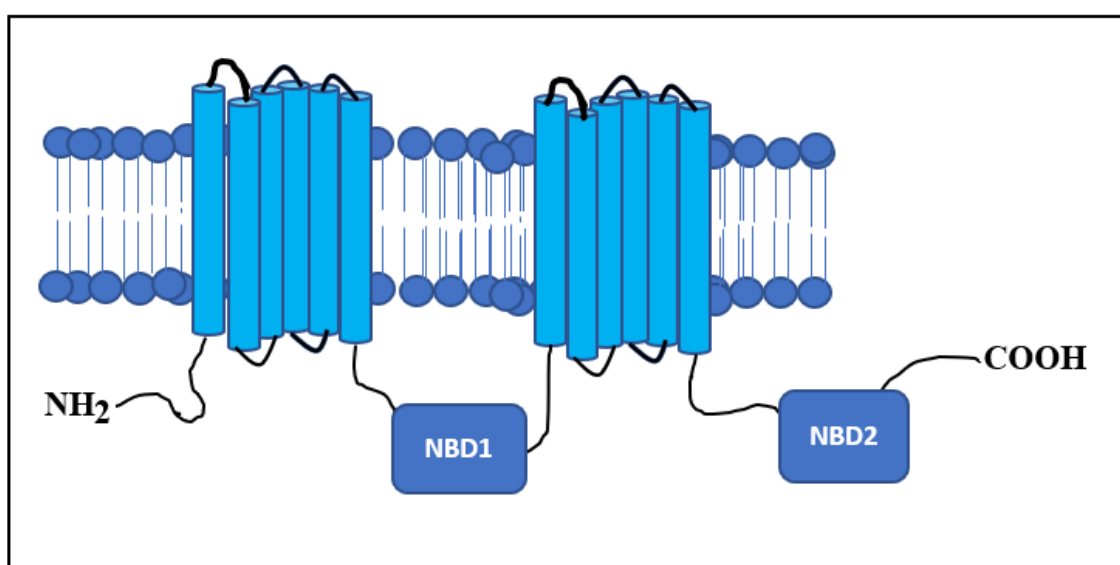


Figura 7. Domínios transmembrana dos sistemas de efluxo da superfamília ABC

Fonte: Elaborado pelo autor.

As bombas de efluxo desta classe constituem um mecanismo notável de resistência antimicrobiana de parasitas, bactérias e fungos. A superfamília ABC está presente em eventos de resistência do *Plasmodium falciparum* a diversos antimaláricos, tais como cloroquina, quinina, mefloquina, halofantrina. Esse processo é mediado por um transportador ABC que codifica o gene 1 de resistência a múltiplos fármacos. O gênero *Mycobacterium* possui abundância de bombas de efluxo, que atuam extrudando substâncias químicas potencialmente prejudiciais, do citoplasma para o meio extracelular (Tintino, 2021).

No *Mycobacterium tuberculosis* esses genes de resistência compreendem cerca de 2,5% do genoma total, sendo comum, por exemplo, o surgimento de mutações cromossômicas em gidB (uma rRNA metiltransferase para 16S rRNA) estão altamente associadas a estreptomicina. Na espécie de fungo *Candida albicans*, a resistência a azóis é bastante comum, pois a bomba de efluxo do tipo ABC aumento da liberação dos antifúngicos azólicos devido

ao acúmulo de mutações no ERG 11, gene que codifica o 14- α -esterol demetilase (Vinogradov, 2012; Kanwar, 2011).

3.4.6 Superfamília PACE (*Proteobacterial antimicrobial compound efflux*)

A superfamília PACE (*Proteobacterial antimicrobial compound efflux*) foi recentemente descrita, sendo capaz de conferir resistência a uma variedade de antibióticos e antissépticos. As bombas de efluxo desta família são codificadas por bactérias Gram-negativas, através de genes tipicamente conservados nos genomas centrais das espécies bacterianas (Hassan *et al.*, 2018).

As proteínas da superfamília PACE podem conter quatro domínios α -hélices transmembranares, organizadas em dois domínios de pares transmembranares bacterianos. Diversas proteínas desta família foram elucidadas experimentalmente por superexpressão e purificação. Sua expressão em cepas de *E. coli* indica sua localização na membrana interna (Elbourne; Hassan, 2017).

As proteínas da superfamília PACE apresentam forte conservação da sequência de aminoácidos entre suas metades aminoterminal e carboxiterminal, sugerindo que elas evoluíram pela duplicação de uma proteína ancestral composta por duas hélices transmembranares (figura 8) (Hassan, et al., 2013).

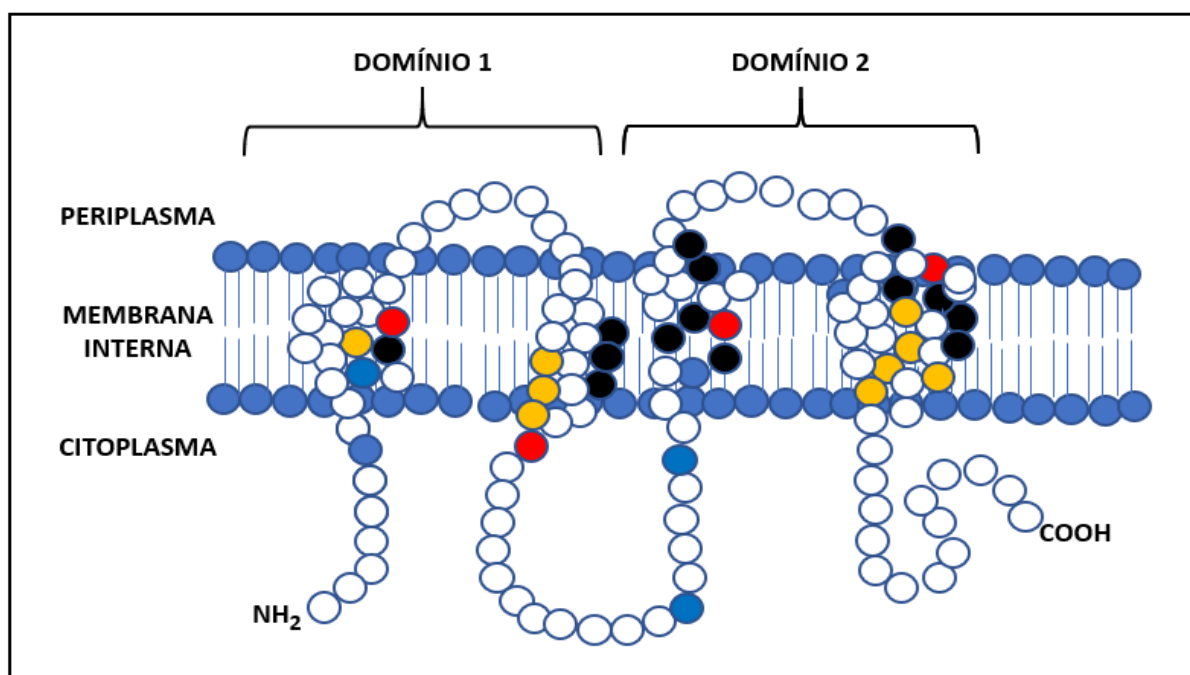


Figura 8. Estrutura tridimensional transmembrana da superfamília PACE.
Fonte: Elaborado pelo autor.

O perfil de resistência a medicamentos das bombas de efluxo da superfamília PACE inclui principalmente biocidas sintéticos. A PACE é capaz de mediar o transporte dos substratos fluorescentes proflavina e acriflavina. Até à data, pelo menos dez substratos putativos foram identificados para proteínas da família PACE. As proteínas desta família foram incorporadas ao banco de dados de classificação de transportadores sob o título original da família, a família proteobacteriana de efluxo de clorexidina (CHX) (número TCDB: 2.A.117), e são capturadas no banco de dados TransportDB 2.0, que cataloga todas as supostas proteínas de transporte de genomas sequenciados no banco de dados NCBI RefSeq (Hassan, *et al.*, 2013; Tucker, *et al.*, 2014).

3.5 Bombas de efluxo específicas

3.5.1 Bomba de efluxo NorA

A bomba de efluxo NorA consiste em um sistema de resistência a multidrogas, pertencente à superfamília grande facilitadora (MFS) frequentemente encontrada em *S. aureus*. Esse sistema de efluxo consiste em transportar para fora da célula antibióticos hidrofóbicos da classe das fluorquinolonas, como por exemplo, norfloxacino e ciprofloxacino. A proteína NorA é codificada pelo gene 1164 bp *norA*, apresentando variedade genética composta por três alelos (NorA-I, NorA-II e NorA-III), diferindo apenas na sequência nucleotídica e polipeptídica (Lekshmi *et al.*, 2018; Martin, 2023).

A NorA é uma proteína composta por 388 aminoácidos e 12 estruturas transmembranas do tipo α -hélice. Essa estrutura é capaz de realizar a extrusão de compostos químicos estruturalmente diferentes como o Brometo de Etídeo (EtBr), além de substâncias lipofílicas e monocíclicas como ceftriaxona, cloreto de benzalcônio, brometo de tetrafenilfosfônio e acriflavina (Lekshmi *et al.*, 2018; Tintino, 2021; Martin, 2023).

A bomba de efluxo do tipo NorA usa a força próton-motriz, através de um gradiente de prótons transmembrana como fonte energética para a extrusão do antimicrobiano fluorquinolônico para o meio extracelular, realizando o antiporte/droga/H⁺ (Palazotti *et al.*, 2019).

3.5.2 Bomba de efluxo Tet(K)

A bomba efluxo de drogas do tipo Tet(K) é um sistema proteico composto por 14 domínios α -hélice transmembrana da superfamília MFS, responsável pela extrusão de antimicrobianos da classe das tetraciclinas. A Tet(K) é codificada através do gen *tet(K)* de bactérias gram-positivas e gram-negativas, sendo menos comum nas últimas (Palazotti *et al.*, 2019).

O sistema de efluxo Tet(K) atua através de bomba de prótons por força-motriz do tipo antiporte. Nesse processo ocorre a troca do complexo antibiótico-Mg²⁺ do citoplasma bacteriano, por íons H⁺, aumentando o bombeamento da tetraciclina para o meio extracelular e impedindo assim, a inibição da síntese proteica através da porção 30S do ribossomo (Martin, 2023).

3.5.3 Bomba de efluxo MsrA

O Sistema de efluxo MsrA é codificado através do gene *msrA* e apresenta resistência à antimicrobianos do grupo dos macrolídeos, principalmente a eritromicina. A bomba é uma proteína composta por 488 aminoácidos e 14 domínios α -hélices transmembranas, pertencente à superfamília dos transportadores ABC. A bomba de efluxo MsrA é bastante comum em bactérias Gram-positivas, tais como o *S. aureus*, na cepa selvagem RN4220 (Tintino, 2018; Martin, 2023).

A bomba de MsrA funciona através do transportador ABC, no qual são requeridos dois domínios de ligação ao ATP no citoplasma, que interagem com mais dois domínios hidrofóbicos transmembranares, que se apresentam como proteínas separadas ou fundidas em polipeptídeos multifuncionais (Tintino, 2021).

3.5.4 Bomba de efluxo MepA

A MepA é uma bomba de efluxo comum em bactérias Gram-positivas como o *S. aureus*. Consiste em uma proteína composta por 451 aminoácidos e 14 α -hélices transmembrana, codificada pelo gene *mepA*. Está inserida na superfamília do tipo MATE, que são bombas de extrusão para diversos fármacos e toxinas. A fonte de energia para extrusão do substrato para meio extracelular resulta no gradiente de prótons, através do antiporte de íons sódio (Na⁺) (Da Costa *et. al.*, 2021; Rezende-Júnior *et. al.*, 2020; Rocha *et. al.*, 2021).

Os substratos de extrusão do tipo MepA compreendem antimicrobianos da classe das fluoroquinolonas hidrofílicas (substratos fracos), fluoroquinolonas hidrofóbicas

(moxifloxacina, sparfloxacina), tigeciclina, cloreto de benzalcônio, dequalinium, tetrafenilfosfônio, ceftrimida, pentamidina e corantes como brometo de etídio (Tintino, 2021; Martin, 2023).

3.6 Inibidores de bomba de efluxo

Os inibidores de bomba de efluxo são compostos que apresentam a capacidade de impedir a ação do mecanismo de extrusão de compostos do interior das células antibacterianas. Diversos estudos mostram que as bombas de efluxo estão envolvidas nas características de resistência dos microorganismos a antibióticos, representando um risco para o tratamento de infecções por fungos e bactérias (Gram-positivas e Gram-negativas) (Tintino, 2018; Albuquerque, 2022).

Segundo Tintino (2018), um bom inibidor de bomba de efluxo deve ser livre de qualquer atividade farmacológica em células eucarióticas, pois podem levar ao desenvolvimento de mecanismos de resistência contra os inibidores de bombas de efluxo. Além disso, devem ser comercialmente viáveis, de fácil isolamento, purificação e solubilidade e baixa toxicidade.

Atualmente, existem compostos que são capazes de inibir os mecanismos de efluxo das bactérias multirresistentes. No entanto, apesar das vantagens, esses compostos possuem diversos efeitos colaterais e problemas de incompatibilidade química. Diante disso, surge a necessidade de desenvolvimento de novos compostos inibidores de bomba (Tintino, 2018; Albuquerque, 2022).

O desenvolvimento de inibidores de bomba de efluxo pode seguir várias estratégias tais como: testagem de novos compostos, modificação de fármacos existentes; compostos que interferem com a montagem e funcionamento de bombas de efluxo, através bloqueio do canal da membrana externa; desacopladores de energia requerida pelas bombas de efluxo; e interferência com as etapas de regulação da expressão de genes de bombas de efluxo (Tintino, 2018; Albuquerque, 2022).

3.6.1 Classificação dos inibidores de bombas de efluxo

Desacopladores de energia das bombas de efluxo

Geralmente, as bombas utilizam o mecanismo de força motriz de prótons como fonte de energia. Logo, compostos que atuem dissipando essa força podem atuar como inibidor de bomba de efluxo. Os compostos *Carbonyl-Cyanide-mChloroPhenyl-hydrazone* (CCCP) valinomicina e dinitrofenol (DNP) são exemplos clássicos que atuam por modificação do potencial eletroquímico transmembrana. No entanto, eles não devem ser utilizados clinicamente, pois apresentam elevada toxicidade celular (Tintino *et al.*, 2021).

Inibidores de ligação direta das bombas de efluxo

Os inibidores de ligação são compostos que atuam através de uso *off-label*, isto é, são fármacos que já existem para outros fins terapêuticos, mas que se apresentam ação sobre a inibição do mecanismo de efluxo. A reserpina e o verapamil são fármacos que atuam normalmente como anti-hipertensivos, mas que se mostraram capazes de inibir bombas de efluxo. A reserpina, por exemplo, atua como inibidor de bombas de efluxo do tipo NorA em cepas de *Staphylococcus aureus* (Myers *et al.*, 2010).

Inibidores peptidomiméticos

Os inibidores de bomba peptidomiméticos são compostos inibidores de ligação intermediários. O *Phenylalanine Arginyl β -Naphthylamide* (PA β N), após vários testes mostrou efeito de redução da concentração inibitória mínima (CIM) do brometo e de ciprofloxacino com bombas NorA. O MC-207 é um inibidor competitivo de bomba de efluxo e atua por ligação num local mais perto do local de ligação do substrato aos antibióticos (German; Kaatz; Kerns, 2008).

Inibidores de efluxo de células eucarióticas

Os inibidores efluxo de células eucarióticas são compostos que já possuem farmacocinética e perfil de toxicidade bem definidos, sendo mais indicados para potencialização de efeito de antibióticos. Representantes deste grupo tal como: compostos fenólicos, epigallocatequina-galato são capazes de reverter a ação de bombas de efluxo do tipo TetB e TetK que determinam resistência a tetraciclina (Li; Nikaido, 2004).

Oligonucleotídeos antimensageiros e anticorpos

Os inibidores desta classe são capazes atuar através de oligonucleotídeos antimensageiros sobre a bomba de efluxo alvo. Estudos recentes mostraram que a bomba de efluxo AcrAB em cepas de *E. coli* é inibida através de um antimensageiro de oligonucleótido fosforotioato, restaurando as atividades de fluoroquinolonas (norfloxacin e ciprofloxacina) (Yoshihara; Inoko, 2011; Oethinger; Levy, 2011).

Análogos de antibióticos

Os compostos que compõem essa categoria de inibidores atuam na potencialização de ação de antibióticos existentes e com ação sobre bombas de efluxo. Diversos análogos foram elucidados como por exemplo, os análogos de tetraciclina, que são capazes de aumentarem a susceptibilidade do fármaco frente a cepas resistentes de *S. aureus*. Os análogos de aminoglicosídeos mostram ação contra a bactéria *Haemophilus influenzae*, aumentando a susceptibilidade de estirpes resistentes à gentamicina e a tetraciclina. Os análogos de fluoroquinolona são eficazes em potencializar a atividade dos antibióticos da classe contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Nelson; Alekshun, 2004). No entanto, uma vez que estes compostos apresentam semelhanças estruturais com os antibióticos, podem apresentar a desvantagem de ter atividade antimicrobiana uma vez que, os torna possível de seleção por outros mecanismos de resistência contra o mesmo antibiótico. (Myers *et al.*, 2010)

3.7 Alcaloides terpênicos

Os terpenos representam uma diversificada classe de produtos naturais de plantas com características biológicas funcionais e de considerável valor comercial nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia. Diante disso, os terpenos são frequentes alvos de estudo em pesquisas científicas que visam o desenvolvimento de fármacos. Dentro da classe dos terpenos, os sesquiterpenos recebem ênfase especial, pois geralmente apresentam-se de forma majoritária em óleos essenciais (Moura; Martins; Silva, 2019).

3.7.2 Sesquiterpenos

Os sesquiterpenos representam uma das maiores classes de terpenos, com uma diversidade estrutural que inclui milhares de compostos e mais de 100 tipos diferentes de esqueletos carbonados (Vasas, 2011).

Diversos estudos já demonstraram que alguns compostos naturais extraídos de óleos essenciais como sesquiterpenos apresentam atividade na inibição do mecanismo de resistência bacteriano como bombas de efluxo, em cepas resistentes de *Staphylococcus aureus*. Espinoza *et al.* (2019) mostraram que os compostos 15-copaenol e epi-cubenol inibiram o efluxo de brometo de etídio (EtBr), mesmo em concentração mais baixa, com um efeito inibidor mais significativo do que o cianeto de carbonila m-clorofenil hidrazona (CCCP), um inibidor padrão de bombas de efluxo.

Sun *et al.* (2019) demonstraram que sesquiterpenos, mesmo aqueles com baixa atividade antibacteriana, conseguiram inibir bombas de efluxo, apresentando atividade sinérgica em associação com antibióticos convencionais, melhorando a terapêutica e o perfil de segurança.

Estes compostos são funcionais e biologicamente importantes para o homem, chamando a atenção de cientistas que se debruçam sobre as características fitoquímicas e sobre as atividades biológicas dessa classe. Dentre esses sesquiterpenos destacam-se o nerolidol, farnesol, α -bisabolol, trans-cariofileno e óxido de cariofileno (Alarif *et al.*, 2019; Fraga, 2012).

Nerolidol

O nerolidol (3,7,11-trimetil-1,6,10-dodecatrien-3-ol) é um sesquiterpeno comum em óleos essenciais de inúmeras plantas. Estudos mostram que este terpenoide apresenta atividade antitumoral, repelente, antioxidante, antinociceptiva, ansiolítica, antiparasitária, antifúngica, antimicrobiana, antiulcerogênica e anti-inflamatória. Sua estrutura molecular consiste em um álcool insaturado acíclico e de cadeia ramificada que possui dois isômeros *cis* (Z) e *trans* (E) e dois enantiômeros R e S, sendo a forma *trans*-(E)-nerolidol a mais prevalente nas espécies vegetais (Figura 9) (Melo *et al.*, 2012; Diniz *et al.*, 2016).

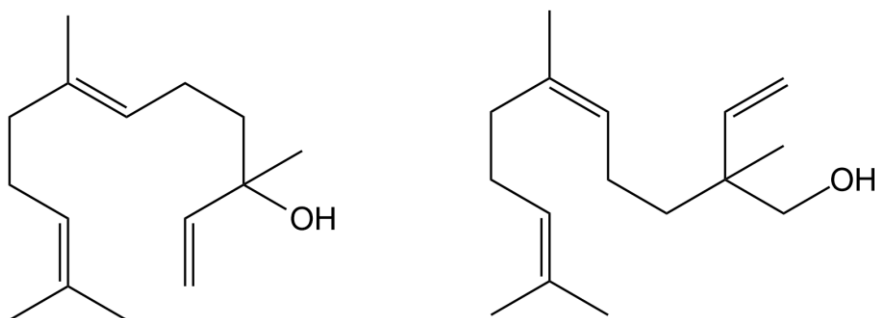


Figura 9. Estrutura química *cis*(Z) e/ou *trans*(E) do nerolidol.
Fonte: Elaborado pelo autor.

O sesquiterpeno pode ser encontrado em óleos essenciais de plantas endêmicas do Brasil como *Piper aleyreanum*, *Piper clausenianum*, *Zornia braziliensis*, *Magnolia denudata* e *Piper aduncum*, encontradas na Caatinga e Cerrado brasileiro (Baldissera, 2018).

Segundo Moura *et al.* (2021), o nerolidol mostrou atividade antibacteriana frente cepas ATCC e isolados clínicos hospitalares com perfil de resistência, sugerindo que, embora essas cepas sejam resistentes a antibióticos, ainda são sensíveis aos sesquiterpenos isolados.

Farnesol

O farnesol ((2Z,6Z)-3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trien-1-ol) é um sesquiterpeno natural alcoólico insaturado composto de 15 carbonos (Figura 10). Está presente nos óleos essenciais de diversas espécies vegetais, onde os primeiros relatos de ocorrência foram observados em flores da espécie *Vachellia farnesiana* L. (Acácia farnese) (Delmondes *et al.* 2020).

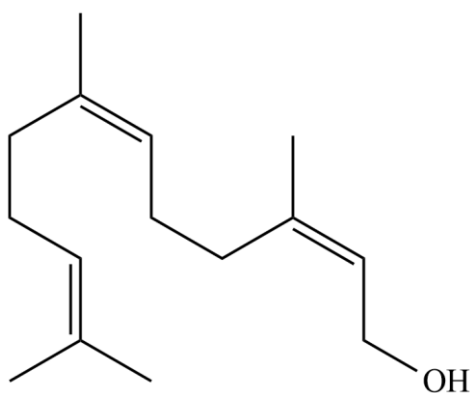


Figura 10. Estrutura química do 2-*cis*-6-*cis*-farnesol.
Fonte: Elaborado pelo autor.

O farnesol é um líquido oleoso, incolor, de aroma doce, delicado e suave, com grande potencial antioxidante, anti-inflamatório, quimiopreventivo, efeito ansiolítico, depressor, analgésico, neuroprotetor, vasodilatador e de diminuição da contratilidade miocárdica. Além disso, este composto tem demonstrado notáveis propriedades farmacológicas antitumorais e ação antimicrobiana através da inibição da formação de biofilmes microbianos (Weber *et al.*, 2008; Castelo-Branco *et al.*, 2016).

Além dos efeitos farmacológicos do farnesol, o composto é amplamente aplicado na indústria cosmética e de perfumaria, sendo frequentemente utilizado para melhorar o aroma de perfumes florais doces (Castelo-Branco *et al.*, 2016).

α -bisabolol

O α -bisabolol (α -4-dimetil- α -(4-metil3-pentenil)-3-ciclo-hexeno-1-metanol) consiste em um sesquiterpeno alcoólico monocíclico (Figura 11), que pode ser isolado a partir das flores das espécies vegetais *Matricaria chamomilla* (camomila alemã) e *Salvia runcinata* (salvia) entre 50 – 90%. A estrutura química do α -bisabolol é constituída por 15 carbonos de fórmula molecular $C_{15}H_{26}O$, odor adocicado, sem coloração e baixa densidade (Souza, *et al.*, 2021).

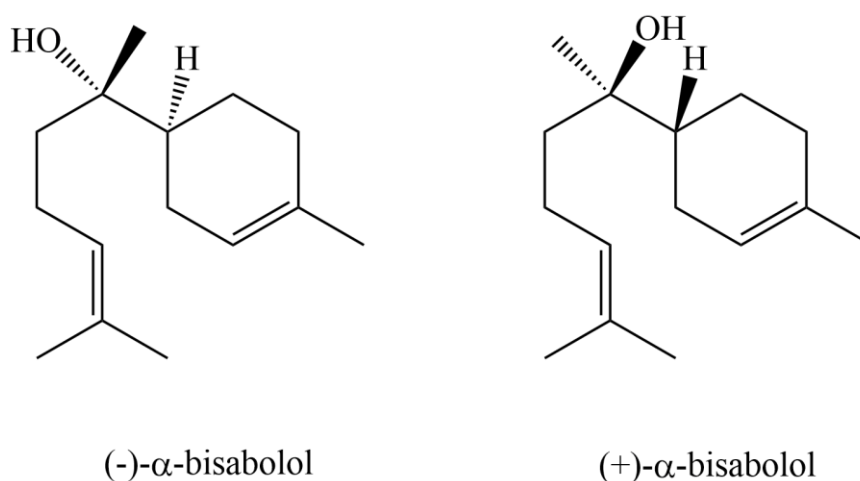


Figura 11. Estrutura química do α -bisabolol.
Fonte: Elaborado pelo autor.

O α -bisabolol é um sesquiterpeno identificado como componente principal e responsável por diversas atividades farmacológicas de óleos essenciais. Este composto tem

sido utilizado como ingrediente em formulações para uso cosmético e dermatológico. Além disso, estudos demonstraram seu potencial para tratamento da dor inflamatória, devido à inibição de diversas citocinas pró-inflamatórias (Guimarães *et al.*, 2013; Maurya *et al.*, 2014; Rocha *et al.*, 2011a).

De acordo com Bezerra (2009), esse sesquiterpeno é capaz de inibir o crescimento de cepas de *S. aureus* ATCC 6538, *C. albicans* ATCC 10231, *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii* nas concentrações de 0,0625 mg/mL, 0,0625 mg/mL e 4 mg/mL. Carcamo *et. al.* (2011), constataram que um enxaguante bucal à base de extrato de camomila (*Matricaria chamomila*) contendo 50-90% de α -bisabolol na composição, apresentou atividade antimicrobiana sendo capaz de manter uma proteção contra bactérias de até 4 horas.

Trans-cariofileno e óxido de cariofileno

O trans-cariofileno (trans-1R,9S- 8-metileno-4,11,11-trimetilbiciclo-undec-4-eno) é um sesquiterpeno insaturado de cadeia cíclica de fórmula $C_{15}H_{24}$ (Figura 12A). É um constituinte importante em várias espécies de óleos essenciais de plantas medicinais usadas na medicina popular do Brasil (Silva, 2010). Esse composto químico é amplamente utilizado como aromatizante de cosméticos. Além disso, em amostras de óleo essencial da espécie *Lippia chevalieri*, o trans-cariofileno apresentou atividade antibacteriana frente *S. aureus* e *Enterococcus hirae* e antifúngica frente *Saccharomyces cerevisiae* (Mevy *et al.*, 2007).

O sesquiterpeno óxido de cariofileno (1R,4R,6R,10S)-4,12,12-trimetill-9-metileno-5-oxatriciclo[8.2.0.0.4,6]dodecano, pode ser encontrado em óleos essenciais, como no cravo ou óleo de lavanda (Figura 12B). Ele também pode ser obtido sinteticamente pela epoxidação do (-) cariofileno, o principal constituinte dos óleos de cravo e copaíba (Faria, 2017).

Vários estudos sobre as bioatividades das espécies vegetais que apresentam este sesquiterpeno em concentrações majoritárias, como a *Lippia alba*, reforçam a importância de seu uso na medicina tradicional. Os óleos essenciais contendo o trans-cariofileno revelaram atividades antivirais, antibacterianas, antifúngicas e antiparasitárias (Alexandra, 2021).

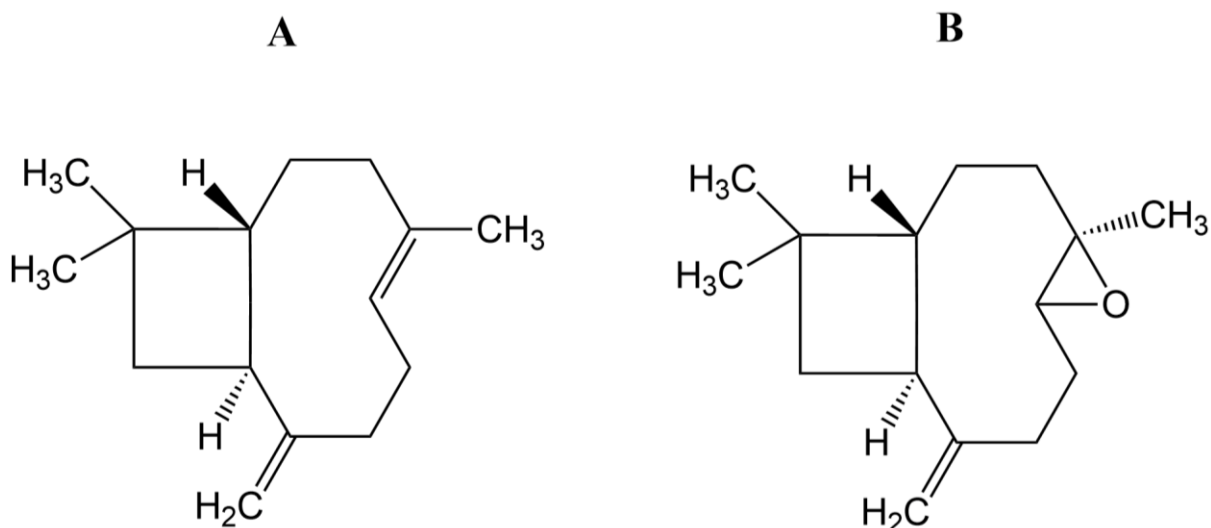


Figura 12. Estrutura química do trans-cariofileno (A) e óxido de cariofileno (B).
Fonte: Elaborado pelo autor.

3.7 Nanotecnologia e suas aplicações na saúde

A nanotecnologia é um campo científico multidisciplinar que tem avançado rapidamente nos últimos anos, encontrando aplicações nas mais diversas áreas, como na indústria farmacêutica. Ela segue o princípio dos materiais na escala nanométrica, aumentando a proporção da área de superfície, melhorando os aspectos de reatividade das partículas e alterando as propriedades farmacológicas dos medicamentos (Tang *et al.*, 2024; Hao *et al.*, 2024).

A aplicação da nanotecnologia na indústria farmacêutica tem sido útil para o desenvolvimento de formulações capazes de melhorar a biodisponibilidade do fármaco, entregando-o ao sítio ativo específico no momento certo, em níveis adequados e com uma cinética de liberação apropriada (Baldissera, 2018).

Os nanoestruturados são estruturas desenvolvidas para aperfeiçoar a ação de fármacos, melhorando as características físico-químicas e sua capacidade de solubilidade e reduzindo sua toxicidade. Além disso, auxilia na proteção do princípio ativo que pode ser inativado por enzimas ou outros fatores que possam degradar o princípio ativo (Nair *et al.*, 2016; He *et al.*, 2024).

3.7.1 Lipossomas

Os lipossomas são vesículas lipídicas esféricas biodegradáveis, constituídas por uma ou mais bicamadas lipídicas naturais ou sintetizadas, que permitem encapsular tanto substâncias hidrofílicas como hidrofóbicas, proporcionando-lhes proteção e estabilidade face às condições exteriores e têm capacidade para transportar mais de um fármaco (Tran *et al.*, 2017).

Os lipossomas possuem importância farmacológica por serem similares às membranas biológicas, facilitando a passagem de substâncias através de barreiras biológicas corporais, devido suas propriedades físico-químicas. A sua eficácia é correlacionada ao seu tamanho, carga elétrica, potencial hidrogeniônico (pH) do meio envolvente, composição lipídica, percentagem de colesterol na sua composição, *Potencial Zeta*, índice de polidispersão, concentração da partícula, intensidade e eficiência de encapsulação (Costa Rico, 2019).

De acordo com estudos de formulação de fármacos, evidenciou-se que os lipossomas podem aumentar a absorção, melhorar a distribuição e prolongar a meia vida plasmática de compostos, melhorando assim o índice terapêutico de diversas drogas. Os lipossomas são de grande utilidade para formulações com sesquiterpenos, os quais apresentam uma limitação de seu potencial farmacológico devido à sua baixa solubilidade em fluidos biológicos. Portanto, quando encapsulados em lipossomas, os sesquiterpenos tendem a permanecer na parte hidrofóbica da membrana do lipossoma (Azzi *et al.*, 2018).

Os principais objetivos da utilização das nanopartículas na produção de formulações farmacêuticas consistem em controlar o tamanho das partículas, as propriedades superficiais e a liberação do fármaco no sítio de ação de modo mais específico e com uma taxa terapêutica e regime de dose adequada ao tratamento (Zhou *et al.*, 2015; Nair *et al.*, 2016).

Os lipossomas são compostos por uma bicamada lipídica ou bicamadas múltiplas em torno do compartimento aquoso interno, sendo classificados em unilamelar e multilamelar. As vesículas são caracterizadas como lipossomas unilamelares pequenos - SUV (*small unilamellar vesicles*) e lipossomas unilamelares grandes - LUV (*large unilamellar vesicles*). Quando considerado o método de preparação, podem ser caracterizadas em vesículas obtidas por evaporação em fase reversa (VER), vesículas obtidas em prensa de French (FPV) e vesículas obtidas por injeção de éter (EIV) (Lasic, 1998; Vemuri, Rhodes, 1995).

Os sistemas lipossomais podem também ser classificados de acordo com as características de interação com sistemas biológicos, sendo denominado como: lipossomas convencionais, de longa circulação, sítio-específicos (imunolipossomas, carreadores de proteínas e peptídeos, virossomas), lipossomas polimórficos (sensíveis ao pH, termossensíveis e catiônicos) (Torchilin, 2005).

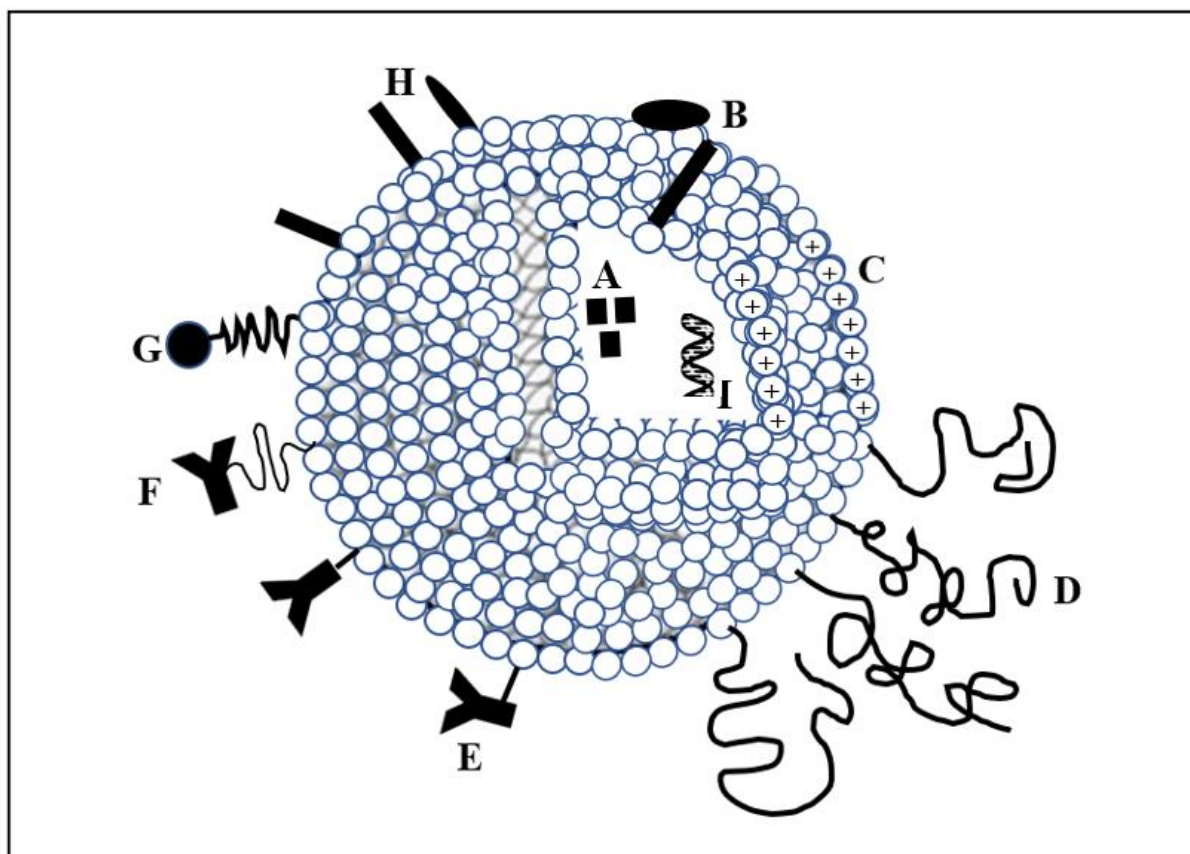


Figura 13. Classificação estrutural dos lipossomas. (A) lipossoma convencional com fármaco hidrofílico; (B) lipossoma com fármaco lipofílico adsorvido; (C) lipossoma catiônico; (D) lipossoma de longa circulação; (E) lipossoma sítio-específico; (F) lipossoma com anticorpos ligantes; (G) lipossoma com peptídeos e proteínas ligantes na superfície; (H) virossoma; (I) lipossoma com DNA-plasmídeo.

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Lipossomas convencionais

As estruturas lipossomais convencionais apresentam em sua composição, fosfolipídeos e colesterol, além de um lipídeo com carga negativa ou positiva para evitar a agregação das vesículas, aumentando a estabilidade em suspensão (Batista *et al.*, 2007).

As nanopartículas lipossomais podem ser facilmente sintetizadas e manipuladas, adicionando moléculas à sua composição. Por exemplo, podem ser encapsulados fármacos hidrofílicos no núcleo aquoso; fármacos lipofílicos intercalados entre as membranas do lipossoma; ou adição de polímeros inertes e biocompatíveis como o polietilenoglicol (PEG) tornando estes mais estáveis e mais solúveis (Figura 14).

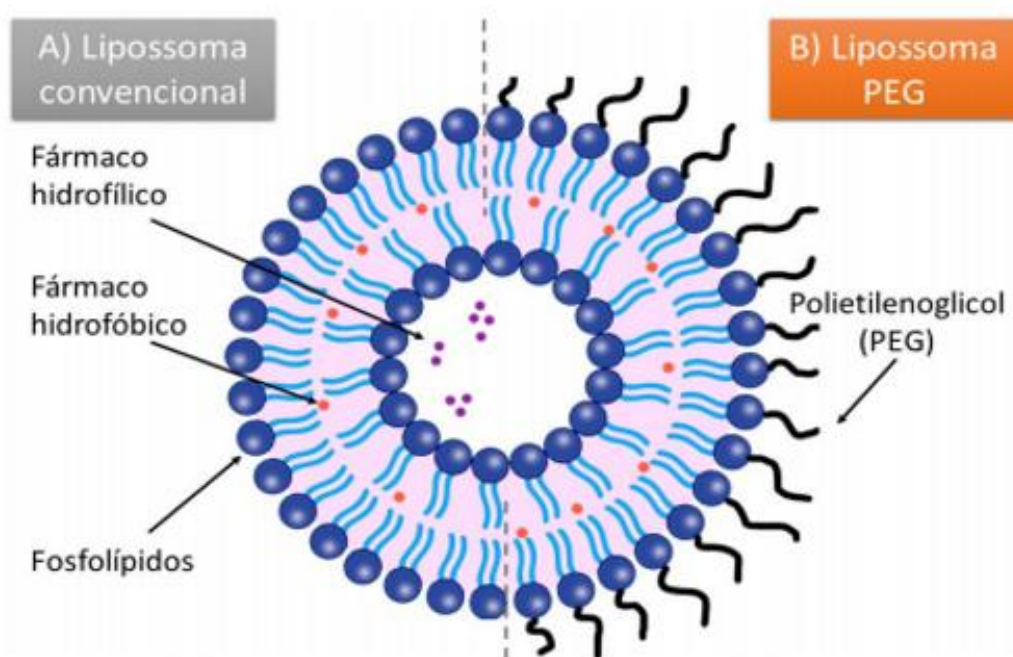


Figura 14. Estrutura do lipossoma transportador de fármacos. (A) Lado esquerdo mostra um lipossoma convencional. (B) No lado direito é esquematizado um lipossoma PEG.
Fonte: Costa Rico, 2019.

Lipossomas de longa circulação

Os lipossomas de longa duração são classificados assim por ser capazes de aumentar o tempo de circulação, inibindo o processo de reconhecimento celular fagocitário mononuclear. São obtidos *in vivo* através de métodos tais como: o revestimento da superfície lipossômica com componentes hidrofílicos naturais (monossialogangliosídeo e fosfatidilinositol) ou polímeros hidrofílicos sintéticos (PEG) (Sagristá *et al.*, 2000; Torchilin, 2005).

Lipossomas sítio-específicos

Os lipossomas sítio-específicos são preparados no sentido de aumentar a especificidade de interação. As vesículas são preparadas por modificação da superfície, na qual os lipídeos escolhidos permitam a conjugação de uma variedade de elementos de reconhecimento. Para isso são utilizados derivados lipídicos reativos como grupamentos amino (fosfatidiletanolamina) e grupamento hidroxila (colesterol ou polietilenoglicol). Pode-se citar como exemplo de ligantes de reconhecimento: anticorpos, glicopeptídeos, polissacarídeos, proteínas virais e lectinas (Edwards, Baeumner, 2006; Batista, 2007).

Imunolipossomas

Os imunolipossomas são compostos lipofílicos que possuem ligantes com a capacidade de aumentar o acúmulo de fármacos encapsulados nas células e tecidos alvo, como: Imunoglobulinas (Ig) da classe (IgG) e seus fragmentos (Torchilin, 2005).

Lipossomas como carreadores de proteínas e peptídeos

Contêm na superfície compostos biologicamente ativos de origem protéica ou peptídica, como enzimas, hormônios peptídicos e citocinas. Estes lipossomas vêm sendo utilizados no tratamento de doenças hereditárias e do câncer (Torchilin, 2000).

Virossomas

Os virossomas são lipossomas utilizados na potencialização do efeito de vacinas encapsuladas com liberação específica do antígeno. Contêm hemaglutinina na superfície, que o direcionado para se ligar a resíduos de ácido sialíco na membrana das células. Os lipossomas são endocitados promovendo modificação conformacional na hemaglutinina, fundindo-se com a membrana endocítica (Kaneda, 2000; Kersten, Crommelin, 2003).

Lipossomas polimórficos

Os lipossomas polimórficos são compostos que se tornam reativos devido à mudança na estrutura desencadeada pela variação de pH (sensíveis ao pH), temperatura (termossensíveis) e carga iônica (catiônico). Os lipossomas sensíveis ao pH são preparados com compostos que reagem facilmente através da variação do pH do meio, tais como: fosfatidiletanolaminas insaturadas e hemissuccinato de colesterila. Seu uso é comum na liberação de fármacos no citoplasma ou no tecido intersticial de células tumorais (pH menor que o pH fisiológico normal) (Derycke, Witte, 2004).

Os termossensíveis são compostos por uma mistura de lipídeos sintéticos, como dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) e diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), que possuem uma temperatura alguns graus acima da fisiológica (Sandip *et al.*, 2000; Carvalho Jr. *et al.*, 2007). Por fim, os lipossomas catiônicos apresentam carga positiva na superfície, sendo utilizados para liberação de ácidos nucleicos dentro das células (Dass, Choong, 2006; El-Aneed, 2004).

3.7.2 Perfil físico-químico dos lipossomas

Tamanho médio das partículas

O tamanho médio das nanopartículas é um parâmetro que pode influenciar sua atividade biológica, pois diferentes tamanhos de partículas podem exibir graus distintos de biodistribuição, absorção e eficácia terapêutica em diferentes alvos. Aproximar tamanhos de partículas de lipossomas em torno de 100 nm, é particularmente relevante porque esse tamanho está associado à atividade biológica aprimorada. Isso implica que a formulação pode ser mais eficaz na administração de seus compostos ativos, levando a resultados terapêuticos superiores (Moazeni *et al.*, 2016; Caster *et al.*, 2017).

No entanto, é importante enfatizar que a atividade biológica final também é influenciada por fatores como composição do lipossomo, carga de superfície, morfologia e propriedades de liberação do composto ativo encapsulado (Moazeni *et al.*, 2016; Caster *et al.*, 2017).

Intensidade

A intensidade está relacionada ao número de partículas na amostra e à eficiência de encapsulamento dos sesquiterpenos encapsulados. Este parâmetro é usado como uma medida indireta para estimar a quantidade de agente encapsulado em relação à quantidade total de partículas presentes (Li *et al.*, 2016).

Potencial Zeta

O potencial Zeta, variando de -24,1 mV a 28,2 mV nas formulações, serve como um indicador da carga de partículas e estabilidade coloidal. O potencial Zeta é uma medida da carga elétrica de nanopartículas e é indicativo de sua estabilidade coloidal. Este valor fornece informações sobre a repulsão eletrostática entre partículas, a tendência de agregação e a interação com células e tecidos (Honary; Zahir, 2013).

O potencial é determinado pela diferença de potencial entre a superfície das partículas e o líquido dispersante circundante. É influenciado por vários fatores, como força iônica, composição da suspensão, pH e interações interfaciais. Valores mais distantes de zero indicam maior estabilidade da suspensão (Smith *et al.*, 2017).

Concentração dos lipossomas

A concentração se refere à quantidade de nanopartículas presentes por mL da amostra analisada. Além das implicações relacionadas à segurança e eficácia, a concentração de nanopartículas também pode impactar as propriedades físicas e químicas das partículas. Por exemplo, a estabilidade coloidal das nanopartículas pode ser influenciada pela concentração (Wilhelm *et al.*, 2016).

Um estudo conduzido por Hufschmid *et al.* (2019) investigou a estabilidade de nanopartículas de óxido de ferro em diferentes concentrações, onde os resultados revelaram que altas concentrações de nanopartículas levaram a uma maior taxa de aglomeração e sedimentação, o que poderia comprometer a estabilidade coloidal das partículas.

A concentração de nanopartículas na solução pode influenciar a dosagem e a eficácia terapêutica. Embora concentrações mais elevadas de nanopartículas resultem em maior bioatividade e biodisponibilidade mais rápida, também podem potencializar sua toxicidade. Altas concentrações de nanopartículas podem se acumular em tecidos e órgãos, levando ao estresse oxidativo, danos celulares e, conseqüentemente, efeitos adversos. Portanto, é necessário encontrar a concentração ideal para ação farmacológica (Wilhelm *et al.*, 2016; González-Vega *et al.*, 2022).

Índice de polidispersão (IDP)

O índice de polidispersão é uma medida da uniformidade do tamanho das partículas dentro da amostra. Valores próximo a 1 indicam que as partículas têm tamanhos semelhantes, enquanto o mais alto sugere uma distribuição de tamanho mais ampla, sugerindo uma distribuição de tamanho mais ampla de partículas suspensas (Danaei *et al.*, 2018; Hoseini *et al.*, 2023).

A microfluídica é reconhecida por sua precisão na formação de lipossomas, permitindo o controle preciso do tamanho e uniformidade das partículas. A alta eficiência de mistura e cisalhamento dentro dos microcanais resultam em lipossomas de tamanho consistente. A microfluídica pode ser mais eficiente em lipídios em comparação a outros métodos, reduzindo assim os custos e otimizando a formulação (Danaei *et al.*, 2018; Hoseini *et al.*, 2023).

Eficiência de encapsulamento

A eficiência de encapsulamento se refere à quantidade de sesquiterpeno encapsulado na nanopartícula lipídica. Valores mais altos indicam maior eficiência de encapsulamento. Um estudo conduzido por Minelli *et al.* (2012) investigou a eficácia de nanopartículas lipídicas sólidas contendo farnesol na inibição do crescimento de células cancerígenas do cólon. Os resultados mostraram que as nanopartículas carregadas com farnesol exibiram uma maior taxa de internalização em células cancerígenas e induziram maior apoptose em comparação ao farnesol livre.

Além disso, as nanopartículas demonstraram menor toxicidade para células saudáveis. Esses estudos destacam a importância das nanopartículas no aumento da eficiência de entrega de sesquiterpenos e na melhoria de suas atividades terapêuticas. As nanopartículas permitem a proteção dos sesquiterpenos contra a degradação e permitem sua liberação controlada no local alvo. Além disso, a formulação de nanopartículas pode aumentar a solubilidade em água dos sesquiterpenos, permitindo uma administração mais eficaz (Gonzalez Gomez; Hosseinidoust, 2020).

4 METODOLOGIA

4.1 Substâncias utilizadas em pesquisa

Foram utilizados os sesquiterpenos nerolidol ($C_{15}H_{26}O$), farnesol ($C_{15}H_{26}O$), α -bisabolol ($C_{15}H_{26}O$), trans-cariofileno e óxido de cariofileno. O Cianeto de carbonila m-clorofenil-hidrazona (CCCP) foi usado como inibidor padrão da bomba de efluxo para controle positivo. O agente intercalante de DNA utilizado foi o brometo de etídio (EtBr). Antibióticos específicos foram utilizados como substratos para cada bomba de efluxo bacteriano: norfloxacin para a cepa *S. aureus* 1199B portadora de NorA; tetraciclina para a cepa IS-58 de *S. aureus* portadora de Tet(K); eritromicina para a cepa de *S. aureus* RN4220 que transporta a proteína MsrA; e fluorquinolonas (ciprofloxacina) para a cepa *S. aureus* K2068 portadora do gene *mepA* que codifica a proteína MepA. Os meios de cultura utilizados foram meio sólido *Heart Infusion Agar* (HIA, Difco, Forn El Chebbak, Líbano) e meio líquido *Brain Heart Infusion* (BHI). Todos os produtos foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

4.3 Síntese de nanoformulações lipossomais

Inicialmente, utilizou-se uma solução altamente concentrada de 50 mg/mL de cada sesquiterpeno (nerolidol, farnesol, α -bisabolol, trans-carifileno e óxido de cariofileno) para o encapsulamento. Para criar a fase orgânica que constituiu as nanopartículas lipossomais, foi preparada uma solução lipídica composta por 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), colesterol (CHOL) e distearoilfosfatidilcolina (DSPC) em uma proporção de DPPC:CHOL:DSPC a 52:45:3 (mol/mol) para atingir uma concentração lipídica final de 35 mM. A técnica de microfluídica foi empregada utilizando o equipamento *NanoAssemblr Benchtop* (Precision NanosystemsTM, Vancouver, BC, Canadá), para a fabricação de nanopartículas.

Para otimizar a eficiência do encapsulamento, foram utilizados os seguintes fatores: taxa de fluxo de 2:1 e taxa de fluxo total de 12 mL/min para as seringas esquerda e direita, respectivamente. Na seringa da esquerda foi adicionada a fase aquosa contendo a solução diluída de sesquiterpeno até atingir volume total de 3 mL. Na seringa da direita foi adicionada a solução lipídica com volume total de 1 mL.

Para a preparação de nanoformulações de controle, ou controles de lipossomas, apenas solução salina tamponada com fosfato (PBS) foi adicionada à seringa esquerda (solução aquosa). Após a preparação das nanopartículas, a formulação resultante foi colocada em *Amicon® Ultra-15 3000 MWCO* (Merck, Darmstadt, Alemanha) e centrifugada a 3000 rpm, 20 °C por 30 min, para remover o solvente residual utilizado na solubilização lipídica. A lavagem foi realizada com tampão PBS a pH 7,2. Finalmente, as formulações foram armazenadas em ambiente refrigerado de 3 °C a 8 °C (Barros *et al.*, 2013)

4.4 Microrganismos utilizados nos ensaios

Foram utilizadas as seguintes cepas: *S. aureus* 1199B, resistente a fluoroquinolonas hidrofílicas via proteína de efluxo NorA; *S. aureus* IS-58, contendo o plasmídeo PT181 carregando o gene Tet(K) que expulsa tetraciclinas; *S. aureus* RN4220, transportando o plasmídeo pUL5054 que transporta o gene para a proteína MsrA que eflui macrólidos (Tabela 1). Todas as cepas foram mantidas em meio HIA a 4 °C e em glicerol em freezer a -80 °C. As cepas portadoras de genes de resistência foram mantidas em meio de cultura sob condições subinibitórias para induzir a expressão gênica.

Tabela 1. Cepas bacterianas de *S. aureus* utilizadas nos ensaios microbiológicos.

Strain	Plasmid/Gene	Protein (Substrate Antibiotic)
1199B	<i>norA</i>	NorA (Norfloxacin)
IS-58	Plasmid PT181 (<i>tetK</i>)	Tet(K) (Tetracyclin)
RN4220	Plasmid Pul5054 (<i>msrA</i>)	MsrA (Erythromycin)
K2068	<i>MepA</i>	MepA

4.5 Atividade antibacteriana avaliada medindo a Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O teste foi realizado para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de sesquiterpenos capazes de inibir o crescimento das cepas 1199B, IS-58 e RN4220 de *S. aureus*. O inóculo bacteriano das três cepas foi preparado em solução salina estéril, correspondendo a uma escala de McFarland de 0,5, que correspondeu a $1,5 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colônias (UFCs). Em seguida, foram preparados meios de distribuição em microtubos, contendo 900 µL de meio de cultura *Brain Heart Infusion (BHI)* e 100 µL do inóculo de bactérias. Um total de 100 µL do conteúdo do tubo foi transferido para uma placa

de microdiluição de 96 poços. Posteriormente, foi realizada uma diluição seriada (1:1) com 100 µL de sesquiterpenos isolados ou encapsulados de nerolidol, farnesol, α -bisabolol, trans-cariofileno e óxido de cariofileno.

As microdiluições foram realizadas até o penúltimo poço, deixando o último poço como controle de crescimento. As concentrações finais de cada sesquiterpeno variaram de 512 µg/mL a 0,5 µg/mL. As placas foram incubadas em incubadoras bacteriológicas por 24 horas a 37°C. Os experimentos foram realizados em triplicata. Na leitura, adicionou-se 20 µL de resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido), observando-se a mudança de cor em cada poço. A coloração azul indicou ausência de crescimento bacteriano, enquanto uma mudança de cor para vermelho indicou crescimento bacteriano.

4.6 Avaliação da inibição das bombas de efluxo NorA, Tet(K), MsrA e MepA

A inibição das bombas de efluxo foi verificada pela redução da CIM dos antibióticos e EtBr contra as cepas de *S. aureus* 1199B, IS-58, RN4220 e K2068. Os inóculos bacterianos foram preparados conforme descrito na seção anterior. As soluções-teste foram preparadas em microplacas contendo 200 µL de inóculo, sesquiterpeno isolado ou encapsulado em concentração subinibitória (MIC/8) e meio de cultura BHI, resultando em volume final de 2 mL. A solução controle continha apenas o inóculo e o meio de cultura.

Posteriormente, as soluções foram transferidas para placas de microdiluição de 96 poços, com adição de 100 µL do conteúdo em cada poço. Em seguida, 100 µL de antibióticos norfloxacin, tetraciclina, eritromicina ou EtBr foram diluídos em série (1:1) até o penúltimo poço, resultando em concentrações variando de 512 µg/mL a 0,5 µg/mL, sendo o controle negativo composto apenas pelo antibiótico ou EtBr. O controle positivo consistiu em CCCP. A leitura foi realizada conforme descrito na seção anterior. A MIC foi definida como a menor concentração na qual não houve crescimento bacteriano no poço, caracterizada pela coloração azul da resazurina.

4.7 Inibição de bombas de efluxo avaliada pelo aumento da emissão de fluorescência de EtBr

A cepa *S. aureus* K2068 foi semeada em meio de cultura sólido HIA e incubada em incubadora bacteriológica a 37 ° C por 24 h antes da realização dos experimentos. O inóculo foi preparado até a obtenção de $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC),

correspondente ao valor 0,5 na escala de *McFarland*. O inóculo foi preparado em PBS. Para o teste, foram selecionados sesquiterpenos que apresentaram os melhores resultados nos ensaios de microdiluição.

Foram preparadas soluções teste (100 µg/mL) dos sesquiterpenos nerolidol, farnesol, α-bisabolol, trans-cariofileno e óxido de cariofileno, contendo o inóculo K2068. O controle positivo utilizado foi CCCP a 50 µg/mL. A Solução Tampão PBS foi adicionado a cada solução para atingir um volume final de 1 mL. As soluções foram incubadas por 1 hora e 30 minutos. Em seguida, EtBr (brometo de etídio) a 100 µg/mL foi adicionado a todas as soluções, exceto ao grupo de inóculo sozinho, que serviu como controle de crescimento. As soluções foram incubadas por mais 1 h. Posteriormente, as soluções foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 2 min e lavadas com PBS para remover todo o EtBr e substâncias do meio. O sobrenadante foi descartado e o sedimento resultante foi dissolvido em PBS. A amostra contendo o pellet dissolvido foi distribuída em microplacas.

A leitura foi realizada utilizando leitor de microplacas de fluorescência *Cytation 1*, *BioTek®* (Winooski, VT, EUA) e *software Gen5™ 3.22* com excitação em 530 nm e comprimento de onda de emissão em 590 nm.

A leitura foi feita para os seguintes grupos:

- Inóculo isolado (controle de crescimento);
- Inóculo + EtBr (controle negativo),
- Inóculo + EtBr + CCCP (controle positivo),
- Inóculo + EtBr + nerolidol 100 µg/mL,
- Inóculo + EtBr + farnesol 100 µg/mL;
- Inóculo + EtBr + α-bisabolol 100 µg/mL.

O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados foram comparados ao grupo controle negativo, EtBr.

4.8 Análise estatística

Os ensaios foram realizados em triplicado. Nos testes microbiológicos, utilizou-se estatística descritiva para cálculo da média geométrica e desvio padrão, e os resultados foram comparados por meio de *ANOVA Two-way*, seguida do *teste post hoc de Bonferroni*. A análise do ensaio de fluorimetria e demais testes foi realizada por meio da *ANOVA One-way*, seguida do teste de Dunnett. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Foi utilizado o software *GraphPad Prism 5.0*.

5 CAPÍTULO 1: ARTIGO ORIGINAL

Artigo Publicado no periódico *Molecules*

Qualis Capes A2 em Biotecnologia

Fator de impacto em 2023: 4.927

Doi.: 10.3390/molecules28227649

Comparative Antibacterial and Efflux Pump Inhibitory Activity of Isolated Nerolidol, Farnesol, and α -Bisabolol Sesquiterpenes and Their Liposomal Nanoformulations

Jorge Ederson Gonçalves Santana ¹, Cícera Datiane de Moraes Oliveira-Tintino ², Gabriel Gonçalves Alencar ², Gustavo Miguel Siqueira ², Daniel Sampaio Alves ², Talysson Felismino Moura ², Saulo Relison Tintino ², Irwin Rose Alencar de Menezes ², João Pedro Viana Rodrigues ³, Vanessa Barbosa Pinheiro Gonçalves³, Roberto Nicolete ³, Talha Bin Emran ^{4,5}, Clara Mariana Gonçalves Lima ^{6,*}, Sheikh F. Ahmad ⁷, Henrique Douglas Melo Coutinho ^{2,*} and Teresinha Gonçalves da Silva ¹

¹ Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife 50670-901, Pernambuco, Brazil.

² Departament of Biological Chemistry, Universidade Regional do Cariri (URCA), Crato 63105-010, Brazil.

³ Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz Ceará), Eusebio 61773-270, Brazil.

⁴ Department of Pathology, Laboratory Medicine, Warren Alpert Medical School and Legorreta Cancer Center, Brown University, Providence, RI 02912, USA.

⁵ Department of Pharmacy, Faculty of Allied Health Sciences, Daffodil International University, Dhaka 1207, Bangladesh.

⁶ Department of Food Science, Federal University of Lavras, Lavras 37203-202, Brazil

⁷ Department of Pharmacology and Toxicology, College of Pharmacy, King Saud University, Riyadh 11451, Saudi Arabia.

* Correspondence: claramarianalima@gmail.com (C.M.G.L.); hdmcoutinho@gmail.com (H.D.M.C.)

Abstract

The efflux systems are considered important mechanisms of bacterial resistance due to their ability to extrude various antibiotics. Several naturally occurring compounds, such as sesquiterpenes, have demonstrated antibacterial activity and the ability to inhibit efflux pumps in resistant strains. Therefore, the objective of this research was to analyze the antibacterial and inhibitory activity of the efflux systems NorA, Tet(K), MsrA, and MepA by sesquiterpenes nerolidol, farnesol, and α -bisabolol, used either individually or in liposomal nanoformulation, against multi-resistant *Staphylococcus aureus* strains. The methodology consisted of in vitro testing of the ability of sesquiterpenes to reduce the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and enhance the action of antibiotics and ethidium bromide (EtBr) in broth microdilution assays. The following strains were used: *S. aureus* 1199B carrying the NorA efflux pump, resistant to norfloxacin; IS-58 strain carrying Tet(K), resistant to tetracyclines; RN4220 carrying MsrA, conferring resistance to erythromycin. For the EtBr fluorescence measurement test, K2068 carrying MepA was used. It was observed the individual sesquiterpenes exhibited better antibacterial activity as well as efflux pump inhibition. Farnesol showed the lowest MIC of 16.5 $\mu\text{g/mL}$ against the *S. aureus* RN4220 strain. Isolated nerolidol stood out for reducing the MIC of EtBr to 5 $\mu\text{g/mL}$ in the 1199B strain, yielding better results than the positive control CCCP, indicating strong evidence of NorA inhibition. The liposome formulations did not show promising results, except for liposome/farnesol, which reduced the MIC of EtBr against 1199B and RN4220. Further research is needed to evaluate the mechanisms of action involved in the inhibition of resistance mechanisms by the tested compounds.

Keywords: efflux pump; fluorescence; liposome; nanoformulation; sesquiterpenes; *Staphylococcus aureus*

5.1 Introduction

The indiscriminate use of antibiotics has influenced the alarming levels of bacterial resistance to multiple drugs. Bacterial resistance to antibiotics is a natural, evolutionary, and adaptive phenomenon of these microorganisms, causing inactivation or reducing the action of antibiotics and biocides. Among the existing resistance mechanisms, active efflux systems stand out, which reduce the intracellular concentration of the antibiotic in the bacterial cell [1–3].

Efflux pumps are considered one of the most important mechanisms of bacterial resistance due to their broad range of substrates. They can be found in Gram-positive and Gram-negative bacteria, facilitating the extrusion of almost all existing classes of conventional antibiotics [4–9].

Research on efflux pumps is growing, aiming to develop or enhance effective drugs. In this perspective, many studies have evaluated medicinal plants that show high potential for inhibiting bacterial infections [10]. Many bioactive compounds present in medicinal plants demonstrate direct antimicrobial activity, synergistic action, and potentiation of drugs, as well as inhibition of bacterial resistance mechanisms. Among the studied classes, sesquiterpenes are active metabolites of essential oils from medicinal plants that possess important antimicrobial characteristics [11,12].

Studies have shown sesquiterpenes exhibit activity in inhibiting efflux pumps in resistant strains of *Staphylococcus aureus*. Furthermore, formulation and encapsulation studies have demonstrated liposomal nanoformulations can enhance absorption, improve distribution, and prolong the plasma half-life of compounds such as sesquiterpenes, which have limitations in their pharmacological potential due to their low solubility in biological fluids [13–16].

Liposomes are artificial vesicles composed of one or more concentric phospholipid bilayers. They are formed from phospholipids and cholesterol, which are biocompatible and non-toxic materials. These phospholipids have a hydrophilic head and a hydrophobic tail made of fatty acids, providing compartments of different polarities and compatibility for encapsulating hydrophilic or hydrophobic compounds. They have the ability to trap lipophilic agents in the lipid membrane and hydrophilic compounds in the aqueous core. The physicochemical properties of liposomes, such as permeability, membrane fluidity, charge density, determine the interaction of liposomes with the body's targets after systemic administration, making them an efficient drug carrier system [17–19].

Research has shown the significant bioactivity of naturally sourced compounds encapsulated in liposomes. Among these biological activities, one can mention antibacterial action [20], antioxidant [21–23], antitumoral [24,25], and protection against neurodegenerative diseases [26]. Sesquiterpenes are organic compounds with lipophilic characteristics. Many substances, such as proteins, lipid-polymer conjugates, and fats, are frequently used as vehicles for lipophilic substances. The use of nanoformulation technology facilitates the delivery of sesquiterpenes without altering their organoleptic characteristics and physicochemical properties [27,28].

Innovations using vesicular carriers are on the rise due to their proven effectiveness in drug delivery, enhancing the bioactivity of compounds for topical or systemic action [29]. Various vesicular carrier systems have demonstrated in vitro antimicrobial action, leading to the optimization of the drug [30].

Currently, research into new targets for antibiotic therapy is on the rise. In this regard, the search for different strategies to inhibit efflux pumps is essential to restore the effectiveness of antibiotics. Therefore, the discovery of natural compounds that can act as antibiotic adjuvants or inhibit resistance mechanisms becomes relevant. Furthermore, the liposomal encapsulation of bioactive molecules has shown promise in antimicrobial treatment because liposomes enhance the delivery and distribution of the drug within biological systems [20].

In light of this, the present study aims to analyze the inhibitory activity of the efflux systems NorA, Tet(K), MsrA, and MepA by sesquiterpenes nerolidol, farnesol, and α -bisabolol, used individually and in liposomal nanoformulation, against multi-resistant *S. aureus* strains.

5.2 Results and Discussion

5.2.1. Physical-Chemical Profile of Liposomes

The physical-chemical characterization of the nanoformulations consisted of determining the average size of the liposomes, intensity, Zeta potential, concentration, polydispersity index (PDI), and encapsulation efficiency (Table 1).

Table 1. Physical-chemical characteristics of liposomal nanoformulations control and containing nerolidol, farnesol, and α -bisabolol.

	Liposome Control	Liposome/ Nerolidol	Liposome/ Farnesol	Liposome/ α-Bisabolol
Size	218.9 nm $\pm$ 45.1	241.8 nm $\pm$ 73.1	201.4 nm $\pm$ 66.6	183.5 nm $\pm$ 58
Intensity	2.5 a.u.	3 a.u.	5 a.u.	5 a.u.
Zeta potential	−18.8 mV	−24.1 mV	−13 mV	28.2 Mv
Ph	7.4	7.4	7.4	7.4
Concentration	6.99×10^8 particles/mL	6.82×10^8 particles/mL	4.42×10^8 particles/mL	4.02×10^8 particles/mL
Polydispersity index (PDI)	0.50	0.61	0.92	0.755
Encapsulation efficiency	-	85.4%	79%	87%

The nanoformulations presented average sizes of 218.9 nm, 241.8 nm, 201.4 nm, and 183.5 nm, respectively, for the control liposomes and those containing nerolidol, farnesol, and α -bisabolol. The average size of nanoparticles is a parameter that can influence their biological activity. Different particle sizes can exhibit distinct degrees of biodistribution, absorption, and therapeutic efficacy in different targets. Approaching liposome particle sizes around 100 nm, as seen in the α -bisabolol formulation, is particularly relevant because this size is associated with enhanced biological activity. This implies the formulation can be more effective in delivering its active compounds, leading to superior therapeutic outcomes. However, it is important to emphasize the final biological activity is also influenced by factors such as liposome composition, surface charge, morphology, and release properties of the encapsulated active compound [31,32].

Intensity is a widely used technique for determining the concentration and size of particles in suspension. Intensity is related to the number of particles in the sample and the encapsulation efficiency of the encapsulated sesquiterpenes. This parameter is used as an indirect measure to estimate the amount of encapsulated agent relative to the total quantity of particles present [33]. The present study showed satisfactory signal intensity, which was 2.5 a.u., 3 a.u., 5 a.u., and 5 a.u., respectively.

The Zeta potential, ranging from −24.1 mV to 28.2 mV in the formulations, serves as an indicator of particle charge and colloidal stability. The Zeta potential is a measure of the electric charge of nanoparticles and is indicative of their colloidal stability. This value provides information about the electrostatic repulsion between particles, the tendency of

aggregation, and the interaction with cells and tissues. The potential is determined by the potential difference between the surface of the particles and the surrounding dispersing liquid. It is influenced by various factors such as ionic strength, suspension composition, pH, and interfacial interactions [34,35]. Values further from zero indicate more suspension stability. Therefore, the liposomes/sesquiterpenes studied show significant Zeta potential values, which are -18.8 mV, -24.1 mV, -13 mV, and 28.2 mV. Significant Zeta potential values, as observed in the nerolidol and α -bisabolol formulations, suggest good colloidal stability.

Concentration refers to the quantity of nanoparticles present per ml of the analyzed sample. For instance, the nanoformulation containing nerolidol has a concentration of 6.82×10^8 particles/mL, the farnesol formulation contains 4.42×10^8 particles/mL, and the nanoformulation with α -bisabolol contains 4.02 particles/mL. In addition to implications related to safety and efficacy, nanoparticle concentration can also impact the physical and chemical properties of the particles. For example, the colloidal stability of nanoparticles can be influenced by the concentration. A study conducted by Hufschmid et al. [36] investigated the stability of iron oxide nanoparticles at different concentrations. The results revealed high concentrations of nanoparticles led to a higher rate of agglomeration and sedimentation, which could compromise the colloidal stability of the particles.

The concentration of nanoparticles in the solution can influence the dosage and therapeutic efficacy. Although higher concentrations of nanoparticles result in greater bioactivity and faster biodisponibility, it can also potentiate their toxicity [37]. High concentrations of nanoparticles can accumulate in tissues and organs, leading to oxidative stress, cellular damage, and consequently, adverse effects. Therefore, it is necessary to find the ideal concentration for pharmacological action [38].

The Polydispersity Index is a measure of particle size uniformity within the sample. PDI values range from 0.50 (control group) to 0.92 (farnesol formulation). A PDI close to 1 indicates particles have similar sizes, whereas a higher PDI suggests a broader size distribution. The farnesol formulation exhibits a higher PDI, which may indicate greater variation in particle size. The elevated PDI observed in some liposome formulations (up to 0.92) suggests a broader size distribution of suspended particles. However, it is worth highlighting the suitability of the microfluidic technique employed in this study. Microfluidics is renowned for its precision in liposome formation, allowing for precise control of particle size and uniformity. The high mixing efficiency and shear within microchannels result in consistently sized liposomes. Microfluidics can be more lipid-efficient compared to other methods, thereby reducing costs, and optimizing formulation [39,40].

The encapsulation efficiency refers to the amount of sesquiterpene encapsulated in the lipid nanoparticle. Higher values indicate greater encapsulation efficiency. For example, the liposomes studied here showed an encapsulation efficiency of 85%, 79%, and 87%, respectively, for nerolidol, farnesol, and bisabolol, indicating a high percentage of the compound inside the liposome.

A study conducted by Minelli *et. al.* [41] investigated the efficacy of solid lipid nanoparticles carrying farnesol in inhibiting the growth of colon cancer cells. The results showed farnesol-loaded nanoparticles exhibited a higher internalization rate in cancer cells and induced greater apoptosis compared to free farnesol. Additionally, the nanoparticles demonstrated lower toxicity to healthy cells. These studies highlight the importance of nanoparticles in enhancing the delivery efficiency of sesquiterpenes and improving their therapeutic activities. Nanoparticles allow for the protection of sesquiterpenes against degradation and enable their controlled release at the target site. Moreover, nanoparticle formulation can enhance the water solubility of sesquiterpenes, allowing for more effective administration [42].

5.2.2 Antibacterial Activity and Efflux Pump Inhibition Assessed through MIC Reduction

The isolated sesquiterpenes showed direct antibacterial activity, with nerolidol having MIC values of 32 µg/mL and 128 µg/mL against IS-58 and RN4220 strains, respectively. Farnesol presented MIC values of 25.4 µg/mL, 32 µg/mL, and 16 µg/mL against 1199B, IS-58, and RN4220 strains, respectively. α -bisabolol exhibited MIC values of 128 µg/mL, 64 µg/mL, and 161.3 µg/mL against 1199B, IS-58, and RN4220 strains, respectively (Table 2).

Table 2. The minimum inhibitory concentration of isolated and encapsulated nerolidol, farnesol, and α -bisabolol against *S. aureus* strains 1199B, IS-58, and RN4220. Concentrations in (µg/mL).

Compound	1199B	IS-58	RN4220
Nerolidol	1024 µg/mL $\pm$ 0.5	32 µg/mL $\pm$ 0.5 *	128 µg/mL $\pm$ 0.5 *
Farnesol	25.4 µg/mL $\pm$ 0.8 *	32 µg/mL $\pm$ 0.5 *	16 µg/mL $\pm$ 0.5 *
α -bisabolol	128 µg/mL $\pm$ 0.5 *	64 µg/mL $\pm$ 0.5 *	161.3 µg/mL $\pm$ 0.8*

Liposome/Nerolidol	$\geq 1024 \mu\text{g/mL} \pm 0.5$	$\geq 1024 \mu\text{g/mL} \pm 0.5$	$\geq 1024 \mu\text{g/mL} \pm 0.5$
Liposome/Farnesol	$\geq 1024 \mu\text{g/mL} \pm 0.5$	$\geq 1024 \mu\text{g/mL} \pm 0.5$	$\geq 1024 \mu\text{g/mL} \pm 0.5$
Liposome/ α -bisabolol	$\geq 1024 \mu\text{g/mL} \pm 0.5$	$\geq 1024 \mu\text{g/mL} \pm 0.5$	$\geq 1024 \mu\text{g/mL} \pm 0.5$

* Clinically relevant antibacterial activity.

Given sesquiterpenes are organic compounds with lipophilic characteristics, they were incorporated into the lipophilic layer of the liposomes, becoming interspersed within their membrane. With this, the sesquiterpene can be gradually released upon contact with the bacterial membrane or the surrounding environment. The non-promising results observed with the liposome/sesquiterpene complex may have occurred due to the difference between the lipids present in the liposome and the phospholipids in the bacterial membrane of *S. aureus* [43,44].

Figure 1 and Table 3 show the inhibitory action results of the sesquiterpenes nerolidol, farnesol, and α -bisabolol against *S. aureus* 1199B strains carrying the NorA efflux pump. In Figure 1A, it can be observed the combination of nerolidol with norfloxacin significantly reduced the MIC of this antibiotic from 50.6 $\mu\text{g/mL}$ to 12.7 $\mu\text{g/mL}$, compared to the antibiotic control alone, indicating potentiation of the antibacterial activity. The combination of nerolidol with EtBr also reduced the EtBr MIC from 64 $\mu\text{g/mL}$ to 5 $\mu\text{g/mL}$. Both in combination with the antibiotic and in combination with EtBr, nerolidol showed significantly better results than the positive control CCCP. However, nerolidol encapsulated in a liposomal nanoformulation did not show a potentiating effect on norfloxacin or EtBr.

Isolated or encapsulated farnesol, when associated with norfloxacin, did not show significant results in reducing the MIC. However, when associated with EtBr, both isolated and encapsulated farnesol reduced the EtBr MIC to 50 $\mu\text{g/mL}$ and 40.3 $\mu\text{g/mL}$, respectively, compared to the control (64 $\mu\text{g/mL}$) (Figure 1B).

The α -bisabolol in association with norfloxacin did not potentiate the antibacterial action of the antibiotic. When associated with EtBr, isolated α -bisabolol did not have a synergistic effect. However, α -bisabolol in the liposomal nanoformulation showed a synergistic effect with a reduced MIC of 50.8 $\mu\text{g/mL}$, compared to the control of 64 $\mu\text{g/mL}$ (Figure 1C). These results indicate the isolated sesquiterpenes nerolidol and farnesol possibly act on the inhibition of NorA, while the encapsulated forms of farnesol and α -bisabolol may act on the inhibition of NorA.

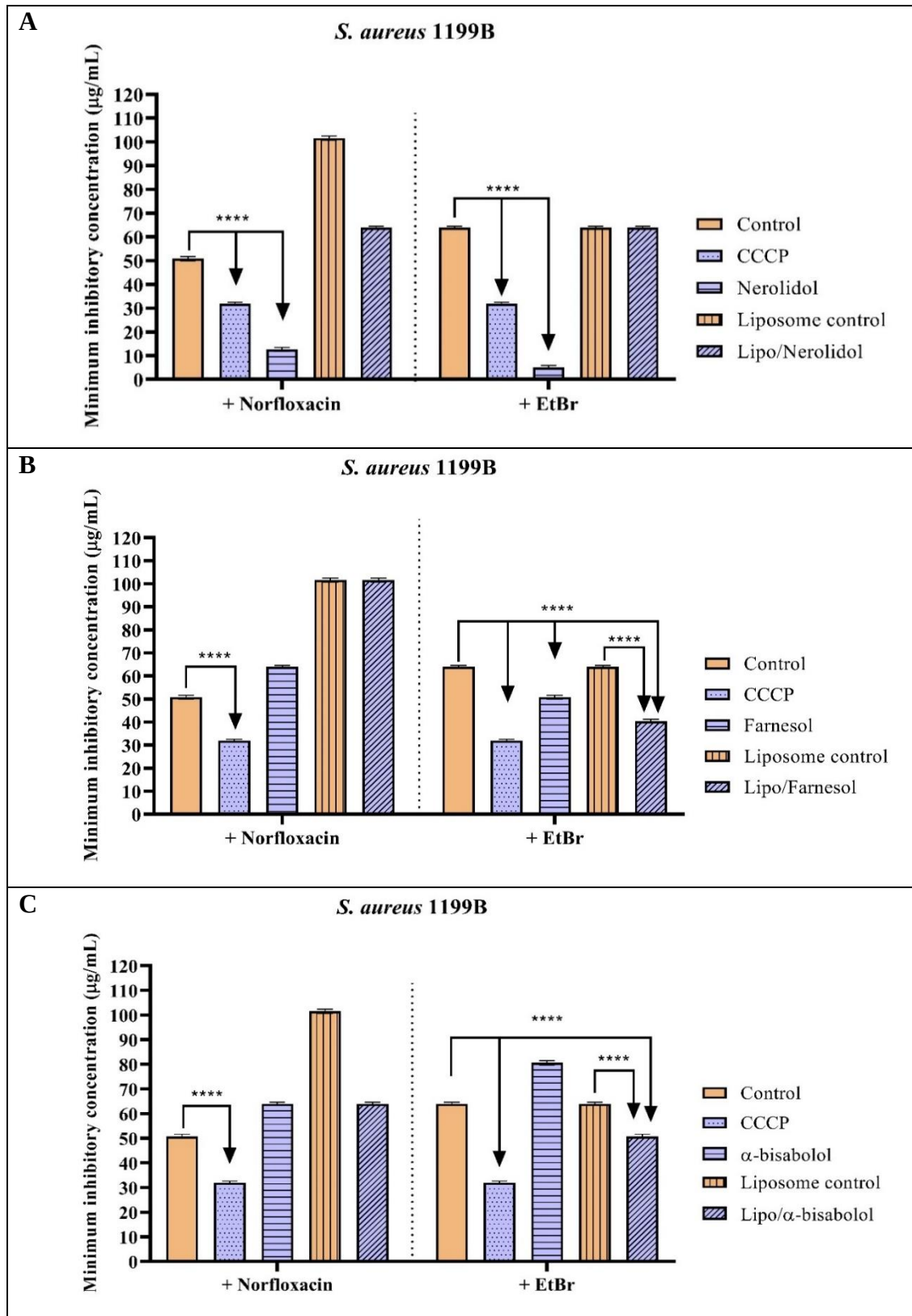


Figure 1. Evaluation of the NorA efflux pump inhibitory activity by nerolidol (A), farnesol (B), and α -bisabolol (C) sesquiterpenes isolated and encapsulated in liposomes, against the *S. aureus* 1199B strain. Associated with norfloxacin and ethidium bromide. Two-way ANOVA

followed by Bonferroni post hoc. CCCP = carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone; EtBr = ethidium bromide; **** = $p < 0.0001$ vs. control.

Table 3. Minimum inhibitory concentration of nerolidol, farnesol, and α -bisabolol sesquiterpenes, whether isolated or encapsulated in liposomes, against the *S. aureus* 1199B strain, associated with norfloxacin and ethidium bromide. * Statistically significant compared to the norfloxacin or EtBr control.

Group with Antibiotic	MIC	Group with EtBr	MIC
Norfloxacin	50.8 $\mu\text{g/mL} \pm 0.8$	EtBr	64 $\mu\text{g/mL} \pm 0.5$
Norfloxacin + CCCP	32 $\mu\text{g/mL} \pm 0.5$ *	EtBr + CCCP	32 $\mu\text{g/mL} \pm 0.5$ *
Norfloxacin + Nerolidol	12.7 $\mu\text{g/mL} \pm 0.8$ *	EtBr + Nerolidol	5 $\mu\text{g/mL} \pm 0.5$ *
Norfloxacin + Farnesol	64 $\mu\text{g/mL} \pm 0.5$	EtBr + Farnesol	50.8 $\mu\text{g/mL} \pm 0.8$ *
Norfloxacin + α -bisabolol	64 $\mu\text{g/mL} \pm 0.5$	EtBr + α -bisabolol	80.6 $\mu\text{g/mL} \pm 0.8$
Norfloxacin + Liposome control	101.6 $\mu\text{g/mL} \pm 0.8$	EtBr + Liposome control	64 $\mu\text{g/mL} \pm 0.5$
Norfloxacin + Liposome/Nerolidol	64 $\mu\text{g/mL} \pm 0.5$	EtBr + Liposome/Nerolidol	64 $\mu\text{g/mL} \pm 0.5$
Norfloxacin + Liposome/Farnesol	101.6 $\mu\text{g/mL} \pm 0.8$	EtBr + Liposome/Farnesol	40.3 $\mu\text{g/mL} \pm 0.8$ *
Norfloxacin + Liposome/ α -bisabolol	64 $\mu\text{g/mL} \pm 0.5$	EtBr + Liposome/ α -bisabolol	50.8 $\mu\text{g/mL} \pm 0.8$ *

Figure 2 shows the results of the action of the sesquiterpenes nerolidol, farnesol, and α -bisabolol against the *S. aureus* IS-58 strain carrying the Tet(K) efflux pump. Among all substances tested, only α -bisabolol exhibited a potentiating effect, reducing the EtBr MIC to 8 $\mu\text{g/mL}$. This result indicates that α -bisabolol may inhibit the Tet(K) efflux mechanism in the *S. aureus* IS-58 strain (Table 4).

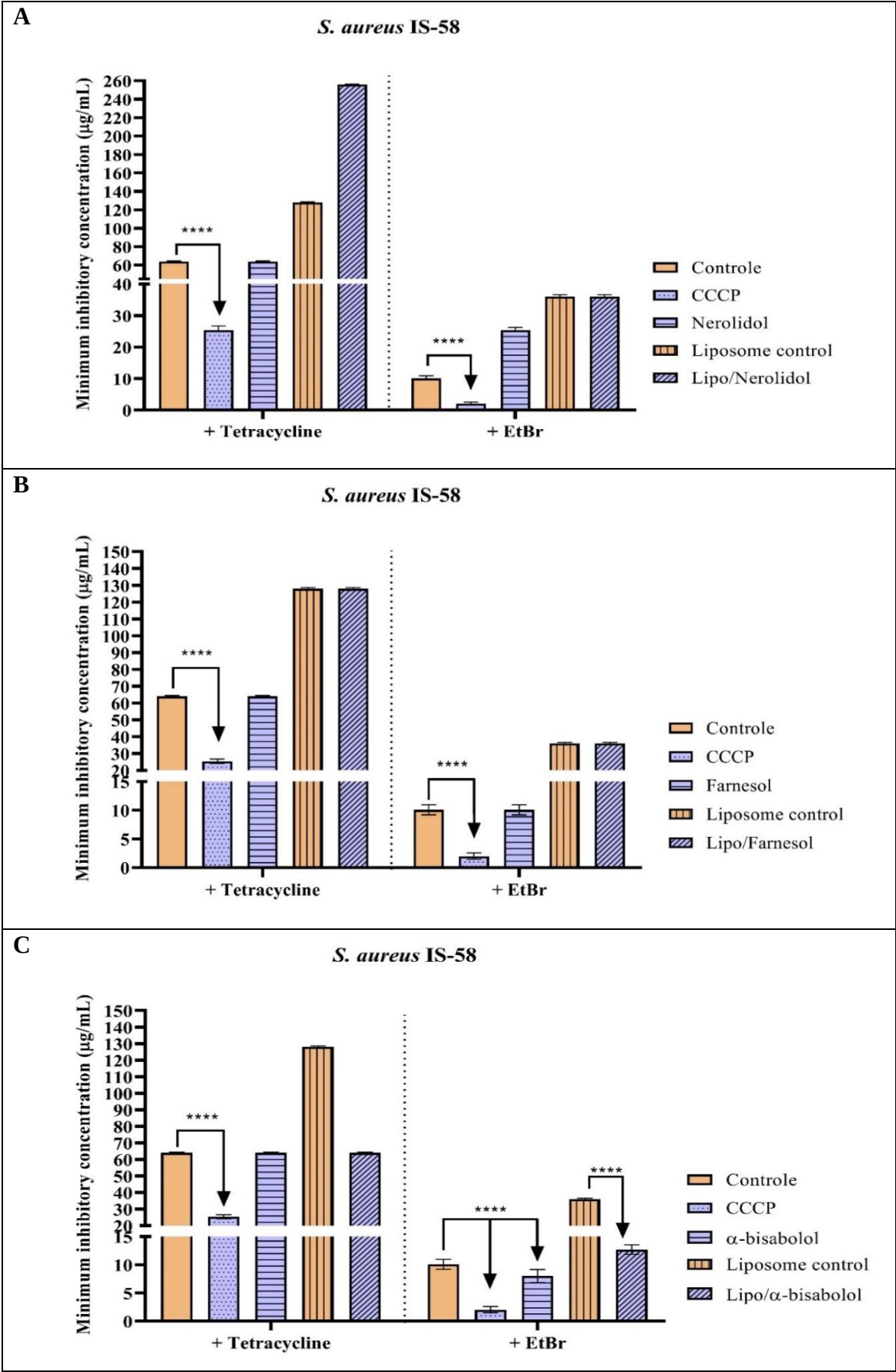


Figure 2. Evaluation of the Tet(K) efflux pump inhibitory activity by the nerolidol (**A**), farnesol (**B**), and α -bisabolol (**C**) sesquiterpenes isolated and encapsulated in liposomes, against the *S. aureus* IS-58 strain. Associated with norfloxacin and ethidium bromide. Two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc. CCCP = Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone; EtBr = ethidium bromide; **** = $p < 0.0001$ vs. control.

Table 4. Minimum inhibitory concentration of nerolidol, farnesol, and α -bisabolol sesquiterpenes, whether isolated or encapsulated in liposomes, against the *S. aureus* IS-58 strain, associated with norfloxacin and ethidium bromide. * Statistically significant compared to the tetracycline or EtBr control.

Group with Antibiotic	MIC	Group with EtBr	MIC
Tetracycline	64 $\mu\text{g/mL} \pm 0.5$	EtBr	10 $\mu\text{g/mL} \pm 0.5$
Tetracycline + CCCP	25.4 $\mu\text{g/mL} \pm 0.8$ *	EtBr + CCCP	2 $\mu\text{g/mL} \pm 0.5$ *
Tetracycline + Nerolidol	64 $\mu\text{g/mL} \pm 0.5$	EtBr + Nerolidol	25.4 $\mu\text{g/mL} \pm 0.8$
Tetracycline + Farnesol	64 $\mu\text{g/mL} \pm 0.5$	EtBr + Farnesol	10 $\mu\text{g/mL} \pm 0.5$
Tetracycline + α -bisabolol	64 $\mu\text{g/mL} \pm 0.5$	EtBr + α -bisabolol	8 $\mu\text{g/mL} \pm 0.5$ *
Tetracycline + Liposome control	128 $\mu\text{g/mL} \pm 0.5$	EtBr + Liposome control	36 $\mu\text{g/mL} \pm 0.5$
Tetracycline + Liposome/Nerolidol	256 $\mu\text{g/mL} \pm 0.5$	EtBr + Liposome/Nerolidol	36 $\mu\text{g/mL} \pm 0.5$
Tetracycline + Liposome/Farnesol	128 $\mu\text{g/mL} \pm 0.5$	EtBr + Liposome/Farnesol	36 $\mu\text{g/mL} \pm 0.5$
Tetracycline + Liposome/ α -bisabolol	64 $\mu\text{g/mL} \pm 0.5$	EtBr + Liposome/ α -bisabolol	12.7 $\mu\text{g/mL} \pm 0.8$

Against the *S. aureus* strain expressing the MsrA efflux system, only farnesol showed significant effects when associated with erythromycin, reducing the erythromycin MIC to 256 $\mu\text{g/mL}$. In association with EtBr, encapsulated nerolidol and isolated and encapsulated farnesol showed significant effects in reducing the MIC to 8 $\mu\text{g/mL}$, 21 $\mu\text{g/mL}$, and 21.8 $\mu\text{g/mL}$, respectively, indicating the occurrence of MsrA efflux pump inhibition (Figure 3 and Table 5).

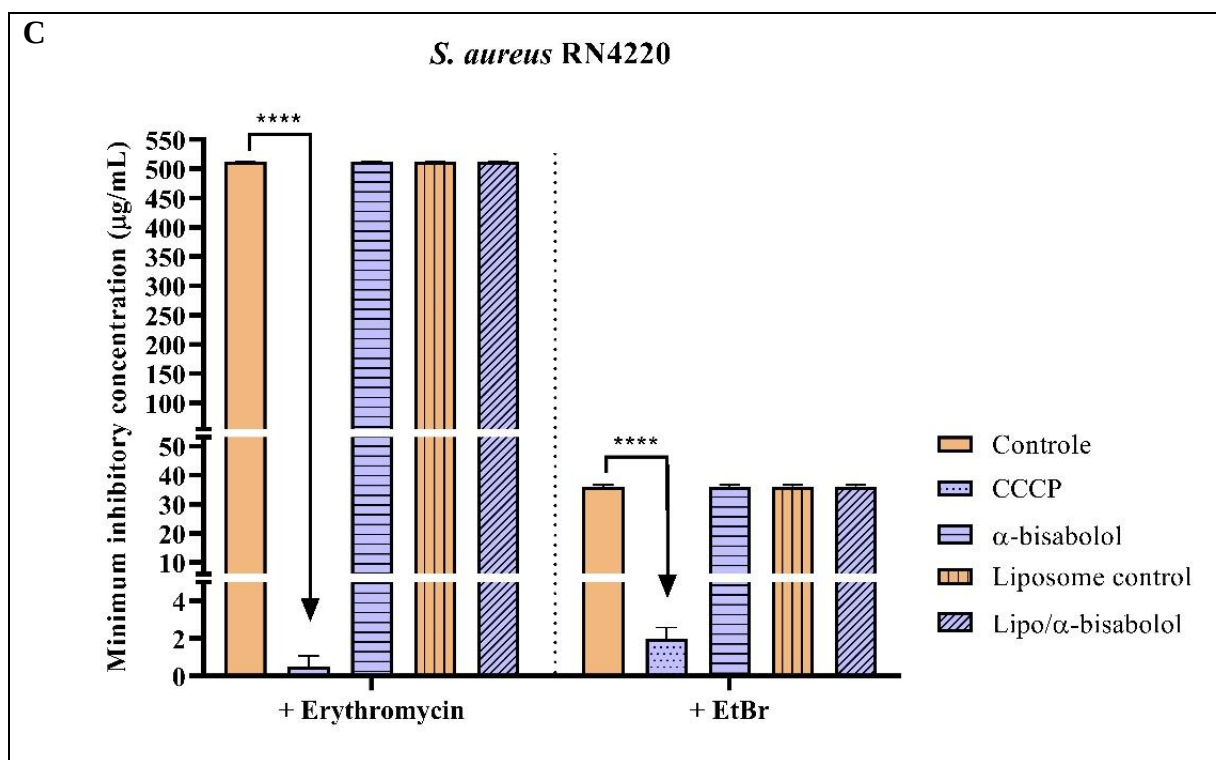


Figure 3. Evaluation of the MsrA efflux pump inhibitory activity by the nerolidol (A), farnesol (B), and α -bisabolol (C) sesquiterpenes isolated and encapsulated in liposomes, against the *S. aureus* RN4220 strain. Associated with erythromycin and ethidium bromide. Two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc. CCCP = Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone; EtBr = ethidium bromide; **** = $p < 0.0001$ vs. control.

Table 5. Minimum inhibitory concentration of nerolidol, farnesol, and α -bisabolol sesquiterpenes, whether isolated or encapsulated in liposomes, against the *S. aureus* RN4220 strain, associated with norfloxacin and ethidium bromide. * Statistically significant compared to the tetracyclin or EtBr control.

Group with Antibiotic	MIC	Group with EtBr	MIC
Erythromycin	512 µg/mL $\pm$ 0.5	EtBr	36 µg/mL $\pm$ 0.5
Erythromycin + CCCP	0.5 µg/mL $\pm$ 0.5*	EtBr + CCCP	2 µg/mL $\pm$ 0.5 *
Erythromycin + Nerolidol	512 µg/mL $\pm$ 0.5	EtBr + Nerolidol	36 µg/mL $\pm$ 0.5
Erythromycin + Farnesol	256 µg/mL $\pm$ 0.5*	EtBr + Farnesol	21.8 µg/mL $\pm$ 0.8*
Erythromycin + α -bisabolol	512 µg/mL $\pm$ 0.5	EtBr + α -bisabolol	36 µg/mL $\pm$ 0.5
Erythromycin + Liposome control	512 µg/mL $\pm$ 0.5	EtBr + Liposome control	36 µg/mL $\pm$ 0.5
Erythromycin + Liposome/Nerolidol	512 µg/mL $\pm$ 0.5	EtBr + Liposome/Nerolidol	8 µg/mL $\pm$ 0.5*

Erythromycin + Liposome/Farnesol	512 µg/mL ± 0.5	EtBr + Liposome/Farnesol	21.8 µg/mL ± 0.8*
Erythromycin + Liposome/α-bisabolol	512 µg/mL ± 0.5	EtBr + Liposome/α- bisabolol	36 µg/mL ± 0.5

The reduction of specific antibiotics' MIC and EtBr by sesquiterpenes is indicative of efflux pump inhibition or potentialization of antibiotic action [45–53]. Secondary metabolites are chemical compounds produced by plants as defense mechanisms against pathogens such as fungi and bacteria, as well as herbivorous animals. They can be useful in treating diseases and infections, exhibiting various proven bioactivities such as antioxidant, antidiabetic, antiproliferative, anti-inflammatory, and antimicrobial actions [54].

According to Alsheikh et al. [55], phytochemicals can exert antimicrobial action through mechanisms distinct from conventional antibiotics, such as inhibiting cell wall synthesis and interfering with bacterial physiology by reducing membrane potential and ATP synthesis. Additionally, they can modulate bacterial susceptibility to antibiotics.

Components of essential oils can act on efflux pumps, restoring the effectiveness of some antibiotics that are targets of resistance mechanisms. Sesquiterpenes exhibit broad antibacterial activity related to their lipophilic characteristics [56]. Oliveira et al. [57] emphasize that sesquiterpenes nerolidol, farnesol, and α-bisabolol have the potential to enhance the activity of conventional antimicrobials, such as gentamicin, oxacillin, and methicillin. Farnesol can potentiate the effect of conventional antimicrobials against *S. aureus* RN4220 strains that produce the MsrA efflux mechanism. In the study, researchers associated the sesquiterpene with fusidic acid, demonstrating the potentiation of this effect on the MIC.

According to Cruz et al. [58], α-bisabolol exhibited potentiating activity against antimicrobials in the presence of *S. aureus* strains expressing the Tet(K) and NorA efflux systems. In their studies, Moura et al. [11] demonstrated nerolidol is an effective sesquiterpene in infection treatment caused by multidrug-resistant bacteria.

In addition to the antimicrobial effects of sesquiterpenes on multidrug-resistant strains, studies reveal liposomal nanoformulations can enhance the therapeutic action of antimicrobials. The encapsulation of farnesol in liposomes resulted in significantly increased antifungal activity against strains of *Candida albicans*, *C. tropicalis*, and *C. krusei*, leading to a considerable reduction in IC₅₀ [59].

Several in vivo and in vitro studies confirm the effectiveness of encapsulating compounds in liposomes, enhancing the antibacterial and anticancer action of these compounds [60–63]. These results are consistent with the data presented for farnesol in

liposomes against the 1199B and RN4220 strains, where there was a reduction in the MIC of EtBr.

5.2.3 Evaluation of Efflux Pump Inhibition by Fluorescence Emission

When measuring fluorescence emission, it was observed nerolidol at 100 $\mu\text{g/mL}$ and farnesol at 100 $\mu\text{g/mL}$ increased fluorescence emission compared to the negative control, which consisted of inoculum plus EtBr. This increase was represented by 31.3% and 17.5%, respectively. The same result was observed with the efflux pump inhibitor CCCP, indicating the reproducibility of the experiment (Figure 4). The average increase in fluorescence suggested the possible inhibition of the MepA efflux pump, considering that inhibition of EtBr efflux led to an increase in its intracellular concentration and, consequently, enhanced the fluorescence of the sample [64–66].

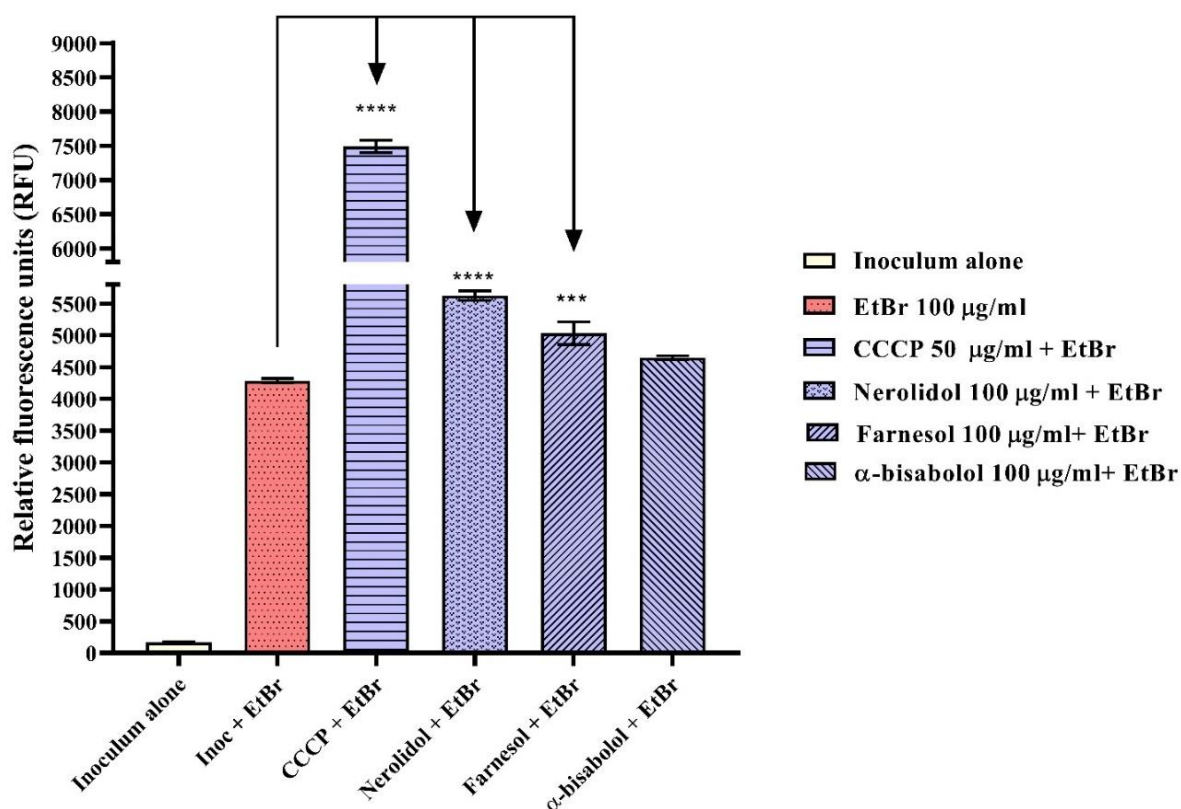


Figure 4. Evaluation of MepA efflux pump inhibition by measuring fluorescence emission in *S. aureus* K2068 strain, treated with nerolidol, farnesol, and α -bisabolol at 100 $\mu\text{g/mL}$. EtBr = ethidium bromide; Inoc = inoculum; **** = $p < 0.0001$ vs. inoc + EtBr; *** = $p < 0.001$ vs. inoc + EtBr.

5.3 Materials and Methods

5.3.1 Substances Used in Research

The sesquiterpenes nerolidol ($C_{15}H_{26}O$), farnesol ($C_{15}H_{26}O$), and α -bisabolol ($C_{15}H_{26}$) were used. Carbonyl cyanide m-chlorophenyl-hydrazone (CCCP) was used as the standard efflux pump inhibitor for positive control. The DNA intercalating agent used was ethidium bromide (EtBr). Specific antibiotics were used as substrates for each bacterial efflux pump: norfloxacin for the *S. aureus* 1199B strain carrying NorA; tetracycline for the *S. aureus* IS-58 strain carrying Tet(K); and erythromycin for the *S. aureus* RN4220 strain carrying the MsrA protein. The culture media used were solid medium Heart Infusion Agar (HIA, Difco, Forn El Chebbak, Lebanon) and liquid medium Brain Heart Infusion (BHI). All products were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

5.3.2 Synthesis of Liposomal Nanoformulations

Initially, a highly concentrated solution of 50 mg/mL of nerolidol, farnesol, and α -bisabolol was prepared for encapsulation. To create the organic phase that constituted the liposomal nanoparticles, a lipid solution was prepared, consisting of 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC), cholesterol (CHOL), and distearoylphosphatidylcholine (DSPC) in a ratio of DPPC:CHOL:DSPC at 52:45:3 (mol/mol) to achieve a final lipid concentration of 35 mM. The microfluidics technique was employed using the NanoAssemblr Benchtop equipment (Precision NanosystemsTM, Vancouver, BC, Canada), For the nanoparticle fabrication. To optimize encapsulation efficiency, the following factors were used: a flow rate ratio of 2:1 and a total flow ratio of 12 mL/min for the left and right syringes, respectively. In the left syringe, the aqueous phase containing the diluted sesquiterpene solution was added until a total volume of 3 mL was reached. In the right syringe, the lipid solution was added with a total volume of 1 mL. For the preparation of control nanoformulations, or liposome controls, only phosphate-buffered saline (PBS) was added to the left syringe (aqueous solution). After the nanoparticle preparation, the resulting formulation was placed in Amicon[®] Ultra-15 3000 MWCO (Merck, Darmstadt, Germany) and centrifuged at 3000 rpm, 20 °C for 30 min, to remove the residual solvent used in lipid solubilization. The washing was performed with PBS buffer at pH 7.2. Finally, the formulations were stored in a refrigerated environment at 3 °C to 8 °C [59].

5.3.3 Microorganisms Used in the Assays

The following strains were used: *S. aureus* 1199B, resistant to hydrophilic fluoroquinolones via the NorA efflux protein; *S. aureus* IS-58, containing the PT181 plasmid carrying the Tet(K) gene that extrudes tetracyclines; *S. aureus* RN4220, carrying the pUL5054 plasmid that carries the gene for the MsrA protein which effluxes macrolides (Table 6). All strains were maintained on HIA medium at 4 °C and in glycerol in a freezer at –80 °C. The resistance gene-carrying strains were maintained in culture medium under subinhibitory antibiotic conditions to induce gene expression.

Table 6. Bacterial strains of *S. aureus* used in the microbiological assays.

Strain	Plasmid/Gene	Protein (Substrate Antibiotic)
1199B	<i>NorA</i>	NorA (Norfloxacin)
IS-58	Plasmid PT181 (<i>tetK</i>)	Tet(K) (Tetracyclin)
RN4220	Plasmid Pul5054 (<i>msrA</i>)	MsrA (Erythromycin)

5.3.4 Antibacterial Activity Evaluated by Measuring the Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

This test consisted of determining the minimum inhibitory concentration (MIC) of sesquiterpenes capable of inhibiting the growth of *S. aureus* strains 1199B, IS-58, and RN4220. The bacterial inoculum of the three strains was prepared in sterile saline solution, corresponding to a McFarland scale of 0.5, which corresponded to 1.5×10^8 Colony-Forming Units. Then, distribution media were prepared in Eppendorf tubes containing 900 µL of Brain Heart Infusion (BHI) culture medium and 100 µL of the inoculum. A total of 100 µL of the tube contents were transferred to a 96-well microdilution plate. Subsequently, a serial dilution (1:1) was performed with 100 µL of either isolated or encapsulated nerolidol, farnesol, or α -bisabolol sesquiterpenes. The microdilution was carried out until the penultimate well, leaving the last well as a growth control. The final concentrations of each sesquiterpene ranged from 512 µg/mL to 0.5 µg/mL. The plates were incubated in a bacteriological incubator for 24 h at 37 °C. The experiments were performed in triplicate. The reading was

performed by adding 20 μ L of resazurin (7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide), observing the change in color in each well. Blue coloration indicated the absence of bacterial growth, while a color change to red indicated bacterial growth [67,68].

5.3.5 Evaluation of the Inhibition of Efflux Pumps *NorA*, *Tet(K)*, and *MsrA*

The inhibition of efflux pumps was verified by the reduction of MIC of antibiotics and EtBr against *S. aureus* strains 1199B, IS-58, and RN4220. Bacterial inocula were prepared as described in the previous section. Test solutions were prepared in Eppendorf tubes containing 200 μ L of inoculum, isolated or encapsulated sesquiterpene at subinhibitory concentration (MIC/8), and BHI culture medium, resulting in a final volume of 2 mL. The control solution contained only the inoculum and culture medium. Subsequently, the solutions were transferred to 96-well microtiter plates, with the addition of 100 μ L of the content in each well. Then, 100 μ L of norfloxacin, tetracycline, erythromycin, or EtBr antibiotics were serially diluted (1:1) until the penultimate well, resulting in concentrations ranging from 512 μ g/mL to 0.5 μ g/mL. The negative control contained only the antibiotic or EtBr alone. The positive control consisted of CCCP. The reading was performed as described in the previous section. The MIC was defined as the lowest concentration at which there was no bacterial growth in the well, characterized by the blue coloration of resazurin [67,68].

5.3.6 Efflux Pumps Inhibition Evaluated by the Increased Fluorescence Emission of EtBr

The strain *S. aureus* K2068 was seeded on a solid HIA culture medium and incubated in a bacteriological incubator at 37 °C for 24 h before conducting the experiments. The inoculum was prepared until obtaining 1.5×10^8 colony forming units (CFU), corresponding to the 0.5 value on the McFarland scale. The inoculum was prepared in PBS. For the test, sesquiterpenes were selected as they showed the best results in microdilution assays. Test solutions were prepared containing the K2068 inoculum and the sesquiterpenes nerolidol, farnesol, and α -bisabolol, all at 100 μ g/mL. The positive control used was CCCP at 50 μ g/mL. PBS buffer was added to each solution to reach a final volume of 1 mL. The solutions were incubated for 1 h and 30 min. Then, EtBr (ethidium bromide) at 100 μ g/mL was added to all solutions except the inoculum alone group, which served as the growth control. The solutions were incubated for an additional 1 h. Subsequently, the solutions were centrifuged at 10,000 rpm for 2 min and washed with PBS to remove all EtBr and medium substances. The

supernatant was discarded, and the resulting pellet was dissolved in PBS. The sample containing the dissolved pellet was distributed into microplates. The reading was performed using Cytation 1, BioTek® (Winooski, VT, USA) fluorescence microplate reader and Gen5™ 3.22 Software with excitation at 530 nm and emission wavelength at 590 nm. The reading was taken for the following groups: inoculum alone (growth control), inoculum + EtBr (negative control), inoculum + EtBr + CCCP (positive control), inoculum + EtBr + nerolidol 100 µg/mL, inoculum + EtBr + farnesol 100 µg/mL, and inoculum + EtBr + α -bisabolol 100 µg/mL. The assay was performed in triplicate, and the results were compared to the negative control group, EtBr [12].

5.3.7 Statistical Analysis

The assays were performed in triplicate. In microbiological tests, descriptive statistics were used to calculate the geometric mean and standard deviation, and the results were compared using Two-way ANOVA, followed by the Bonferroni post hoc test. Analysis of the fluorimetry assay and other tests was carried out using One-way ANOVA, followed by the Dunnett test. Results were considered significant when $p < 0.05$. GraphPad Prism 5.0 software was used.

5.4 Conclusions

Therefore, when isolated, nerolidol exhibited direct antibacterial activity against *S. aureus* IS-58 and RN4220 strains. Isolated farnesol and α -bisabolol showed direct antibacterial activity against *S. aureus* 1199B, IS-58, and RN4220. However, the liposomal formulation of these compounds did not show direct efficacy against *S. aureus* strains. In terms of efflux pump inhibition, these compounds demonstrated effectiveness. Liposome/farnesol and liposome/ α -bisabolol acted as potential inhibitors of NorA present in *S. aureus* 1199B. Liposome/nerolidol and liposome/farnesol acted as potential inhibitors of MsrA in the *S. aureus* RN4220 strain. The isolated sesquiterpenes showed significant action: in their isolated form, nerolidol and farnesol acted as putative inhibitors of NorA and MepA; α -bisabolol acted as a putative inhibitor of Tet(K), and isolated farnesol acted as inhibitor of MsrA and MepA. Among all the substances tested, isolated nerolidol stood out for its potent inhibition of NorA, being even more effective than CCCP. Further studies are necessary to describe the molecular targets involved in these mechanisms.

Author Contributions: Conceptualization, C.M.G.L., T.G.d.S. and C.D.d.M.O.-T.; formal analysis, H.D.M.C., T.G.d.S., C.D.d.M.O.-T., I.R.A.d.M., and R.N.; investigation, J.E.G.S., C.D.d.M.O.-T., G.G.A., G.M.S., D.S.A., T.F.M., S.R.T., J.P.V.R. and V.B.P.G.; writing—original draft preparation, J.E.G.S., C.D.d.M.O.-T. and J.P.V.R.; writing—review and editing, C.D.d.M.O.-T. and T.G.d.S.; supervision, H.D.M.C., T.G.d.S., R.N. and C.D.d.M.O.-T.; project administration, H.D.M.C., T.B.E. and S.F.A.; funding acquisition, H.D.M.C., T.G.d.S., I.R.A.d.M. and R.N. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Cearense Foundation for Supporting Scientific and Technological Development (FUNCAP), grant number DCT-0182-00104.02.00/21 and 04855159/2022 and was funded by King Saud University, Riyadh, Saudi Arabia, Project Number (RSPD2023R709).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All experimental data generated or analyzed during this study are included in the article.

Acknowledgments: The authors acknowledge and extend their appreciation to the Researchers Supporting Project Number (RSPD2023R709), King Saud University, Riyadh, Saudi Arabia, for funding this study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. González-Bello, C. Antibiotic Adjuvants - A Strategy to Unlock Bacterial Resistance to Antibiotics. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 4221–4228, doi:10.1016/J.BMCL.2017.08.027.
2. Du, D.; Wang-Kan, X.; Neuberger, A.; van Veen, H.W.; Pos, K.M.; Piddock, L.J.V.; Luisi, B.F. Multidrug Efflux Pumps: Structure, Function and Regulation. *Nat. Rev. Microbiol.* 2018.
3. Köhler, T.; Pechère, J.C.; Plésiat, P. Bacterial Antibiotic Efflux Systems of Medical Importance. In Proceedings of the Cellular and Molecular Life Sciences; 1999.
4. Uddin, M.J.; Ahn, J. Associations between Resistance Phenotype and Gene Expression in Response to Serial Exposure to Oxacillin and Ciprofloxacin in *Staphylococcus Aureus*. *Lett. Appl. Microbiol.* **2017**, *65*, 462–468, doi:10.1111/lam.12808.
5. Li, X.Z.; Nikaido, H. Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria. *Drugs* 2004.
6. Kaatz, G.W.; McAleese, F.; Seo, S.M. Multidrug Resistance in *Staphylococcus Aureus* Due to Overexpression of a Novel Multidrug and Toxin Extrusion (MATE) Transport Protein. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, doi:10.1128/AAC.49.5.1857-1864.2005.
7. Blair, J.M.A.; Webber, M.A.; Baylay, A.J.; Ogbolu, D.O.; Piddock, L.J. V Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 2015.

8. Domingues Almeida, G.; Pena Godoi, ; Ednalva; Eliziaria, ; Santos, C.; Leonardo, ; Paes De Lima, R.; Emilia De Oliveira, M. Extrato Aquoso de *Allium Sativum* Potencializa a Ação Dos Antibióticos Vancomicina, Gentamicina e Tetraciclina Frente *Staphylococcus Aureus*. *Rev. Ciências Farm. Básica e Apl.* **2013**, *34*, 487–492.
9. de Moura, D.F.; Rocha, T.A.; de Melo Barros, D.; da Silva, M.M.; dos Santos Santana, M.; Neta, B.M.; Cavalcanti, I.M.F.; Martins, R.D.; da Silva, M.V. Evaluation of the Antioxidant, Antibacterial, and Antibiofilm Activity of the Sesquiterpene Nerolidol. *Arch. Microbiol.* **2021**, *203*, 4303–4311, doi:10.1007/S00203-021-02377-5.
10. Tran, S.; DeGiovanni, P.; Piel, B.; Rai, P. Cancer Nanomedicine: A Review of Recent Success in Drug Delivery. *Clin. Transl. Med.* **2017**, *6*, doi:10.1186/S40169-017-0175-0.
11. Liu, G.; Hou, S.; Tong, P.; Li, J. Liposomes: Preparation, Characteristics, and Application Strategies in Analytical Chemistry. <https://doi.org/10.1080/10408347.2020.1805293> **2020**, *52*, 392–412, doi:10.1080/10408347.2020.1805293.
12. Azzi, J.; Auezova, L.; Danjou, P.E.; Fourmentin, S.; Greige-Gerges, H. First Evaluation of Drug-in-Cyclodextrin-in-Liposomes as an Encapsulating System for Nerolidol. *Food Chem.* **2018**, *255*, 399–404, doi:10.1016/J.FOODCHEM.2018.02.055.
13. Camilo, C.J.; Leite, D.O.D.; E Silva, A.R.A.; Menezes, I.R.A.; Coutinho, H.D.M.; da COSTA, J.G.M. Lipid Vesicles: Applications, Principal Components and Methods Used in Their Formulations: A Review. *Acta Biológica Colomb.* **2020**, *25*, 339–352, doi:10.15446/abc.v25n2.74830.
14. Barros, N.B.; Migliaccio, V.; Facundo, V.A.; Ciancaglini, P.; Stábeli, R.G.; Nicolete, R.; Silva-Jardim, I. Liposomal-Lupane System as Alternative Chemotherapy against Cutaneous Leishmaniasis: Macrophage as Target Cell. *Exp. Parasitol.* **2013**, *135*, 337–343, doi:10.1016/j.exppara.2013.07.022.
15. Oliveira-Tintino, C.D. de M.; Tintino, S.R.; Muniz, D.F.; Rodrigues dos Santos Barbosa, C.; Pereira, R.L.S.; Begnini, I.M.; Rebelo, R.A.; da Silva, L.E.; Mireski, S.L.; Nasato, M.C.; et al. Chemical Synthesis, Molecular Docking and MepA Efflux Pump Inhibitory Effect by 1,8-Naphthyridines Sulfonamides. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2021**, *160*, doi:10.1016/j.ejps.2021.105753.
16. CLSI CLSI, M100ED29E. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 29th Informational Supplement*. 20; 29th ed.; 2019; ISBN 9781684400324.
17. Santos Da Silva, L.Y.; Cicera, L.; Roque, P.; Felismino Moura, T.; Alves, D.S.; Torres Pessoa, R.; Moura Araújo, I.; Datiane, C.; Oliveira-Tintino, M.; Relison Tintino, S.; et al. Antibacterial Activity of the Essential Oil of Piper Tuberculatum Jacq. Fruits against Multidrug-Resistant Strains: Inhibition of Efflux Pumps and β -Lactamase. *Plants* **2023**, *Vol. 12*, Page 2377 **2023**, *12*, 2377, doi:10.3390/PLANTS12122377.
18. Caster, J.M.; Yu, S.K.; Patel, A.N.; Newman, N.J.; Lee, Z.J.; Warner, S.B.; Wagner, K.T.; Roche, K.C.; Tian, X.; Min, Y.; et al. Effect of Particle Size on the Biodistribution, Toxicity, and Efficacy of Drug-Loaded Polymeric Nanoparticles in Chemoradiotherapy. *Nanomedicine* **2017**, *13*, 1673, doi:10.1016/J.NANO.2017.03.002.
19. Moazeni, M.; Kelidari, H.R.; Saeedi, M.; Morteza-Semnani, K.; Nabili, M.; Gohar, A.A.; Akbari, J.; Lotfali, E.; Nokhodchi, A. Time to Overcome Fluconazole Resistant Candida Isolates: Solid Lipid Nanoparticles as a Novel Antifungal Drug Delivery System. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **2016**, *142*, 400–407, doi:10.1016/J.COLSURFB.2016.03.013.
20. chem, M.; Liang, X.; Li, C.; Li, X.; Li, S.; Weng, Y.; Wang, K.; Zhang, T.; Chen, S.; Lu, X.; et al. Development and Validation of a Method for Determination of Encapsulation Efficiency of CPT-11/DSPE-MPEG2000 Nanoparticles. *Med chem (Los Angeles), an open access J.* **2016**, *6*, 345–348, doi:10.4172/2161-0444.1000368.

21. Honary, S.; Zahir, F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 2). *Trop. J. Pharm. Res.* **2013**, *12*, 265–273, doi:10.4314/tjpr.v12i2.20.
22. Smith, M.C.; Crist, R.M.; Clogston, J.D.; McNeil, S.E. Zeta Potential: A Case Study of Cationic, Anionic, and Neutral Liposomes. *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, *409*, 5779–5787, doi:10.1007/S00216-017-0527-Z/METRICS.
23. Hufschmid, R.; Teeman, E.; Mehdi, B.L.; Krishnan, K.M.; Browning, N.D. Observing the Colloidal Stability of Iron Oxide Nanoparticles in Situ. *Nanoscale* **2019**, *11*, 13098–13107, doi:10.1039/C9NR03709H.
24. Wilhelm, S.; Tavares, A.J.; Dai, Q.; Ohta, S.; Audet, J.; Dvorak, H.F.; Chan, W.C.W. Analysis of Nanoparticle Delivery to Tumours. *Nat. Rev. Mater.* **2016**, *1*, 1–12, doi:10.1038/natrevmats.2016.14.
25. González-Vega, J.G.; García-Ramos, J.C.; Chavez-Santoscoy, R.A.; Castillo-Quñones, J.E.; Arellano-García, M.E.; Toledano-Magaña, Y. Lung Models to Evaluate Silver Nanoparticles' Toxicity and Their Impact on Human Health. *Nanomater. (Basel, Switzerland)* **2022**, *12*, doi:10.3390/NANO12132316.
26. Minelli, R.; Serpe, L.; Pettazzoni, P.; Minero, V.; Barrera, G.; Gigliotti, C.L.; Mesturini, R.; Rosa, A.C.; Gasco, P.; Vivenza, N.; et al. Cholesteryl Butyrate Solid Lipid Nanoparticles Inhibit the Adhesion and Migration of Colon Cancer Cells. *Br. J. Pharmacol.* **2012**, *166*, 587–601, doi:10.1111/J.1476-5381.2011.01768.X.
27. Gonzalez Gomez, A.; Hosseinidoust, Z. Liposomes for Antibiotic Encapsulation and Delivery. *ACS Infect. Dis.* **2020**, *6*, 896–908, doi:10.1021/ACSINFECDIS.9B00357/ASSET/IMAGES/MEDIUM/ID9B00357_0010.GIF.
28. Kaatz, G.W.; Moudgal, V. V.; Seo, S.M.; Kristiansen, J.E. Phenothiazines and Thioxanthenes Inhibit Multidrug Efflux Pump Activity in Staphylococcus Aureus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, doi:10.1128/AAC.47.2.719-726.2003.
29. Schindler, B.D.; Jacinto, P.; Kaatz, G.W. Inhibition of Drug Efflux Pumps in Staphylococcus Aureus: Current Status of Potentiating Existing Antibiotics. *Future Microbiol.* **2013**.
30. DeMarco, C.E.; Cushing, L.A.; Frempong-Manso, E.; Seo, S.M.; Jaravaza, T.A.A.; Kaatz, G.W. Efflux-Related Resistance to Norfloxacin, Dyes, and Biocides in Bloodstream Isolates of Staphylococcus Aureus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, doi:10.1128/AAC.00430-07.
31. Costa, S.; Falcão, C.; Viveiros, M.; MacHado, D.; Martins, M.; Melo-Cristino, J.; Amaral, L.; Couto, I. Exploring the Contribution of Efflux on the Resistance to Fluoroquinolones in Clinical Isolates of Staphylococcus Aureus. *BMC Microbiol.* **2011**, doi:10.1186/1471-2180-11-241.
32. Kristiansen, J.E.; Thomsen, V.F.; Martins, A.; Viveiros, M.; Amaral, L. Non-Antibiotics Reverse Resistance of Bacteria to Antibiotics. *In Vivo (Brooklyn)*. **2010**.
33. Patel, D.; Kosmidis, C.; Seo, S.M.; Kaatz, G.W. Ethidium Bromide MIC Screening for Enhanced Efflux Pump Gene Expression or Efflux Activity in Staphylococcus Aureus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, doi:10.1128/AAC.01058-10.
34. Piddock, L.J.V. Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **2006**.
35. El-Baky, R.M.A.; Sandle, T.; John, J.; Abuo-Rahma, G.E.D.A.; Hetta, H.F. A Novel Mechanism of Action of Ketoconazole: Inhibition of the Nora Efflux Pump System and Biofilm Formation in Multidrug-Resistant Staphylococcus Aureus. *Infect. Drug Resist.* **2019**, doi:10.2147/IDR.S201124.

36. Ramalhete, C.; Spengler, G.; Martins, A.; Martins, M.; Viveiros, M.; Mulhovo, S.; Ferreira, M.J.U.; Amaral, L. Inhibition of Efflux Pumps in Meticillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* and *Enterococcus Faecalis* Resistant Strains by Triterpenoids from *Momordica Balsamina*. In *Proceedings of the International Journal of Antimicrobial Agents*; 2011.
37. Prakash, B.; Kumar, A.; Singh, P.P.; Songachan, L.S. Antimicrobial and Antioxidant Properties of Phytochemicals. *Funct. Preserv. Prop. Phytochem.* **2020**, 1–45, doi:10.1016/B978-0-12-818593-3.00001-4.
38. Alsheikh, H.M. Al; Sultan, I.; Kumar, V.; Rather, I.A.; Al-sheikh, H.; Jan, A.T.; Haq, Q.M.R. Plant-Based Phytochemicals as Possible Alternative to Antibiotics in Combating Bacterial Drug Resistance. *Antibiotics* **2020**, 9, 1–23, doi:10.3390/ANTIBIOTICS9080480.
39. Kon, K.V.; Rai, M.K. Plant Essential Oils and Their Constituents in Coping with Multidrug-Resistant Bacteria. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **2012**, 10, 775–790, doi:10.1586/ERI.12.57.
40. Oliveira, D.; Borges, A.; Saavedra, M.J.; Borges, F.; Simões, M. Screening of Natural Molecules as Adjuvants to Topical Antibiotics to Treat *Staphylococcus Aureus* from Diabetic Foot Ulcer Infections. *Antibiotics* **2022**, 11, doi:10.3390/ANTIBIOTICS11050620/S1.
41. da Cruz, R.P.; de Freitas, T.S.; Costa, M.D.S.; Dos Santos, A.T.L.; Campina, F.F.; Pereira, R.L.S.; Bezerra, J.W.A.; Quintans-Júnior, L.J.; Araújo, A.A.D.S.; De Siqueira Júnior, J.P.; et al. Effect of α -Bisabolol and Its β -Cyclodextrin Complex as TetK and NorA Efflux Pump Inhibitors in *Staphylococcus Aureus* Strains. *Antibiot. (Basel, Switzerland)* **2020**, 9, doi:10.3390/ANTIBIOTICS9010028.
42. Blair, J.M.A.; Piddock, L.J.V. How to Measure Export via Bacterial Multidrug Resistance Efflux Pumps. *MBio* **2016**, doi:10.1128/mBio.00840-16.
43. Gibbons, S.; Oluwatuyi, M.; Kaatz, G.W. A Novel Inhibitor of Multidrug Efflux Pumps in *Staphylococcus Aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, doi:10.1093/jac/dkg044.
44. Markham, P.N.; Westhaus, E.; Klyachko, K.; Johnson, M.E.; Neyfakh, A.A. Multiple Novel Inhibitors of the NorA Multidrug Transporter of *Staphylococcus Aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, doi:10.1128/aac.43.10.2404.
45. Kaatz, G.W.; Moudgal, V.V.; Seo, S.M.; Kristiansen, J.E. Phenothiazines and Thioxanthenes Inhibit Multidrug Efflux Pump Activity in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, 47, 719–726. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Schindler, B.D.; Jacinto, P.; Kaatz, G.W. Inhibition of Drug Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus*: Current Status of Potentiating Existing Antibiotics. *Future Microbiol.* **2013**, 8, 491–507. [[CrossRef](#)]
47. DeMarco, C.E.; Cushing, L.A.; Frempong-Manso, E.; Seo, S.M.; Jaravaza, T.A.A.; Kaatz, G.W. Efflux-Related Resistance to Norfloxacin, Dyes, and Biocides in Bloodstream Isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, 51, 3235–3239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Costa, S.; Falcão, C.; Viveiros, M.; MacHado, D.; Martins, M.; Melo-Cristino, J.; Amaral, L.; Couto, I. Exploring the Contribution of Efflux on the Resistance to Fluoroquinolones in Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol.* **2011**, 11, 241. [[CrossRef](#)]
49. Kristiansen, J.E.; Thomsen, V.F.; Martins, A.; Viveiros, M.; Amaral, L. Non-Antibiotics Reverse Resistance of Bacteria to Antibiotics. *Vivo* **2010**, 24, 751–754.
50. Patel, D.; Kosmidis, C.; Seo, S.M.; Kaatz, G.W. Ethidium Bromide MIC Screening for Enhanced Efflux Pump Gene Expression or Efflux Activity in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, 54, 5070–5073. [[CrossRef](#)]

51. Piddock, L.J.V. Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **2006**, *19*, 382–402. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. El-Baky, R.M.A.; Sandle, T.; John, J.; Abuo-Rahma, G.E.D.A.; Hetta, H.F. A Novel Mechanism of Action of Ketoconazole: Inhibition of the Nora Efflux Pump System and Biofilm Formation in Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect. Drug Resist.* **2019**, *12*, 1703–1718. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Ramalhete, C.; Spengler, G.; Martins, A.; Martins, M.; Viveiros, M.; Mulhovo, S.; Ferreira, M.J.U.; Amaral, L. Inhibition of Efflux Pumps in Meticillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* Resistant Strains by Triterpenoids from *Momordica balsamina*. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2011**, *37*, 70–74. [[CrossRef](#)]
54. Prakash, B.; Kumar, A.; Singh, P.P.; Songachan, L.S. Antimicrobial and Antioxidant Properties of Phytochemicals. *Funct. Preserv. Prop. Phytochem.* **2020**, *1*, 1–45. [[CrossRef](#)]
55. Al Alsheikh, H.M.; Sultan, I.; Kumar, V.; Rather, I.A.; Al-sheikh, H.; Jan, A.T.; Haq, Q.M.R. Plant-Based Phytochemicals as Possible Alternative to Antibiotics in Combating Bacterial Drug Resistance. *Antibiotics* **2020**, *9*, 480. [[CrossRef](#)]
56. Kon, K.V.; Rai, M.K. Plant Essential Oils and Their Constituents in Coping with Multidrug-Resistant Bacteria. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* **2012**, *10*, 775–790. [[CrossRef](#)]
57. Oliveira, D.; Borges, A.; Saavedra, M.J.; Borges, F.; Simões, M. Screening of Natural Molecules as Adjuvants to Topical Antibiotics to Treat *Staphylococcus aureus* from Diabetic Foot Ulcer Infections. *Antibiotics* **2022**, *11*, 620. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. da Cruz, R.P.; de Freitas, T.S.; Costa, M.D.S.; Dos Santos, A.T.L.; Campina, F.F.; Pereira, R.L.S.; Bezerra, J.W.A.; Quintans-Júnior, L.J.; Araújo, A.A.D.S.; De Siqueira Júnior, J.P.; et al. Effect of α -Bisabolol and Its α -Cyclodextrin Complex as TetK and NorA Efflux Pump Inhibitors in *Staphylococcus aureus* Strains. *Antibiotics* **2020**, *9*, 28. [[CrossRef](#)]
59. Barros, N.B.; Migliaccio, V.; Facundo, V.A.; Ciancaglini, P.; Stábeli, R.G.; Nicolete, R.; Silva-Jardim, I. Liposomal-Lupane System as Alternative Chemotherapy against Cutaneous Leishmaniasis: Macrophage as Target Cell. *Exp. Parasitol.* **2013**, *135*, 337–343. [[CrossRef](#)]
60. Dutta, D.; Paul, B.; Mukherjee, B.; Mondal, L.; Sen, S.; Chowdhury, C.; Debnath, M.C. Nanoencapsulated Betulinic Acid Analogue Distinctively Improves Colorectal Carcinoma In Vitro and In Vivo. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 11506. [[CrossRef](#)]
61. Alavi, S.E.; Koohi Moftakhari Esfahani, M.; Raza, A.; Adelnia, H.; Ebrahimi Shahmabadi, H. PEG-Grafted Liposomes for Enhanced Antibacterial and Antibiotic Activities: An In Vivo Study. *NanoImpact* **2022**, *25*, 100384. [[CrossRef](#)]
62. Webb, M.S.; Boman, N.L.; Wiseman, D.J.; Saxon, D.; Sutton, K.; Wong, K.F.; Logan, P.; Hope, M.J. Antibacterial Efficacy against an In Vivo *Salmonella typhimurium* Infection Model and Pharmacokinetics of a Liposomal Ciprofloxacin Formulation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 45–52. [[CrossRef](#)]
63. Shu, G.; Xu, D.; Zhang, W.; Zhao, X.; Li, H.; Xu, F.; Yin, L.; Peng, X.; Fu, H.; Chang, L.J.; et al. Preparation of Shikonin Liposome and Evaluation of Its In Vitro Antibacterial and In Vivo Infected Wound Healing Activity. *Phytomedicine* **2022**, *99*, 154035. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Blair, J.M.A.; Piddock, L.J.V. How to Measure Export via Bacterial Multidrug Resistance Efflux Pumps. *mBio* **2016**, *7*, e00840-16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

65. Gibbons, S.; Oluwatuyi, M.; Kaatz, G.W. A Novel Inhibitor of Multidrug Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, 51, 13–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Markham, P.N.; Westhaus, E.; Klyachko, K.; Johnson, M.E.; Neyfakh, A.A. Multiple Novel Inhibitors of the NorA Multidrug Transporter of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, 43, 2404–2408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Oliveira-Tintino, C.D.d.M.; Tintino, S.R.; Muniz, D.F.; Rodrigues dos Santos Barbosa, C.; Pereira, R.L.S.; Begnini, I.M.; Rebelo, R.A.; da Silva, L.E.; Mireski, S.L.; Nasato, M.C.; et al. Chemical Synthesis, Molecular Docking and MepA Efflux Pump Inhibitory Effect by 1,8-Naphthyridines Sulfonamides. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2021**, 160, 105753. [[CrossRef](#)]
68. CLSI CLSI, M100ED29E; Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 29th Informational Supplement 20. 29th ed. ANSI:Washington, DC, USA, 2019; ISBN 9781684400324.

6 CAPÍTULO 2: ARTIGO ORIGINAL

Artigo Publicado no periódico *Chemico-Biological Interactions*

Qualis Capes A2 em Biotecnologia

Fator de impacto em 2024: 5.113

Doi: 10.1016/j.cbi.2024.110945

Liposomal nanoformulations with trans-caryophyllene and caryophyllene oxide: do they have an inhibitory action on the efflux pumps NorA, Tet(K), MsrA, and MepA?

Jorge Ederson Gonçalves Santana^a, Cícera Datiane de Moraes Oliveira-Tintino^{b*}, Gabriel Gonçalves Alencar^b, Gustavo Miguel Siqueira^b, José Weverton Almeida-Bezerra^b, João Pedro Viana Rodrigues^c, Vanessa Barbosa Pinheiro Gonçalves^c, Roberto Nicolete^c, Saulo Relison Tintino^b, Henrique Douglas Melo Coutinho^b, Teresinha Gonçalves da Silva^a

^a Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife 50670 901, Pernambuco, Brazil

^b Departament of Biological Chemistry, Universidade Regional do Cariri (URCA), Crato 63105-010, Ceará, Brazil.

^c Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz Ceará), Eusebio 61773-270, Ceará, Brazil.

*Corresponding author: datianemoraes@hotmail.com

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the antibacterial and efflux pump inhibitory action of NorA, Tet(K), MsrA, and MepA in *S. aureus* strains using the sesquiterpenes trans-caryophyllene and caryophyllene oxide, both isolated and encapsulated in liposomes. The antibacterial and efflux pump inhibitory action was assessed through the serial microdilution test in 96-well microplates. Each sesquiterpene and liposome/sesquiterpene was combined with antibiotics and ethidium bromide (EtBr). The antibiotics norfloxacin, tetracycline, and erythromycin were used. The strains of *S. aureus* 1199B, IS-58, RN4220, and K2068 carrying NorA, Tet(K), MsrA, and MepA, respectively, were tested. In the fluorescence measurement test, *S. aureus* K2068 was incubated with the sesquiterpenes and EtBr, and the fluorescence emission by EtBr was measured. The tested substances did not show direct antibacterial activity with MIC > 1024 µg/ml. However, the isolated trans-caryophyllene and caryophyllene oxide reduced the MIC of antibiotics and EtBr, indicating inhibition of NorA, Tet(K), and MsrA. In the fluorescence test, these same sesquiterpenes increased fluorescence emission, indicating inhibition of MepA. Therefore, the trans-caryophyllene and caryophyllene oxide sesquiterpenes did not present direct antibacterial action; however, in their isolated form, they showed possible inhibitory action on NorA, Tet(K), MsrA, and

MepA efflux pumps. They may also act in antibiotic potentiation. Further studies are needed to identify the mechanisms involved in antibiotic potentiation and efflux pump inhibitory action.

Key words: Caryophyllene oxide; Efflux pumps; Liposomes; Nanoencapsulation; Sesquiterpene.

6.1 Introduction

Bacterial resistance to antibiotics has been a significant obstacle to success in conventional antimicrobial therapy. Over time, bacteria have developed mechanisms capable of reducing or inhibiting the therapeutic activity of antibiotics. Among the mechanisms of antibiotic resistance, the following stand out: the reduction of antibiotic concentration inside the cell due to the existence of active efflux systems; alteration of the antibiotic target through spontaneous mutation or structural changes; and enzymatic inactivation systems (for example, bacteria producing beta-lactamase that degrade antibiotics [1,2].

Human behavior has been decisive in reaching alarming levels of multidrug resistance. The main factor concerns the indiscriminate use of antimicrobials and incorrect use of personal protective equipment (PPE) by medical and scientific teams. The emergence of multidrug-resistant bacteria causes infections that are difficult to treat. To inhibit resistance mechanisms, science can use substances of natural origin [3,4].

In this perspective, bioactive compounds extracted from plants have been widely used in combination with conventional drugs in the treatment of various pathologies, especially those caused by microorganisms. These bioactive compounds can not only exhibit direct antibacterial activity but also enhance the effectiveness of antibiotics, increasing their efficacy against multidrug-resistant bacteria [4,5].

Sesquiterpenes constitute a structurally diverse class of terpenoids with an important role in the composition of essential oils, being synthesized by the condensation of pentacarbonyl units, isopentenyl diphosphate, and its isomer dimethylallyl diphosphate [6]. Sesquiterpenes are capable of inhibiting the resistance mechanism of efflux pumps, showing synergistic activity in combination with conventional antibiotics, improving their therapeutic efficacy and safety profile [7,8].

Trans-caryophyllene and caryophyllene oxide are isomeric sesquiterpenes found in many essential oils, for example, in species such as *Artemisia campestris* [9], *Chenopodium ambrosioides* [10], *Copaifera langsdorffii* [11], *Cordia verbenaceae* [12], *Ocimum basilicum* [13], *Ocimum gratissimum* [14], *Piper nigrum* [15], *Psidium guajava* [16], and *Syzygium*

aromaticum [17]. These sesquiterpenes are used in the food and fragrance industry due to their pleasant aroma. They have also been proven to possess biological activities such as anti-inflammatory, antioxidant, and antimicrobial properties, which make them subjects of interest in medical and pharmaceutical research [12,18–23]. Both compounds are liposoluble and can be incorporated into liposomal formulations, specifically in the lipophilic part of the liposomal membrane (Figure 1).

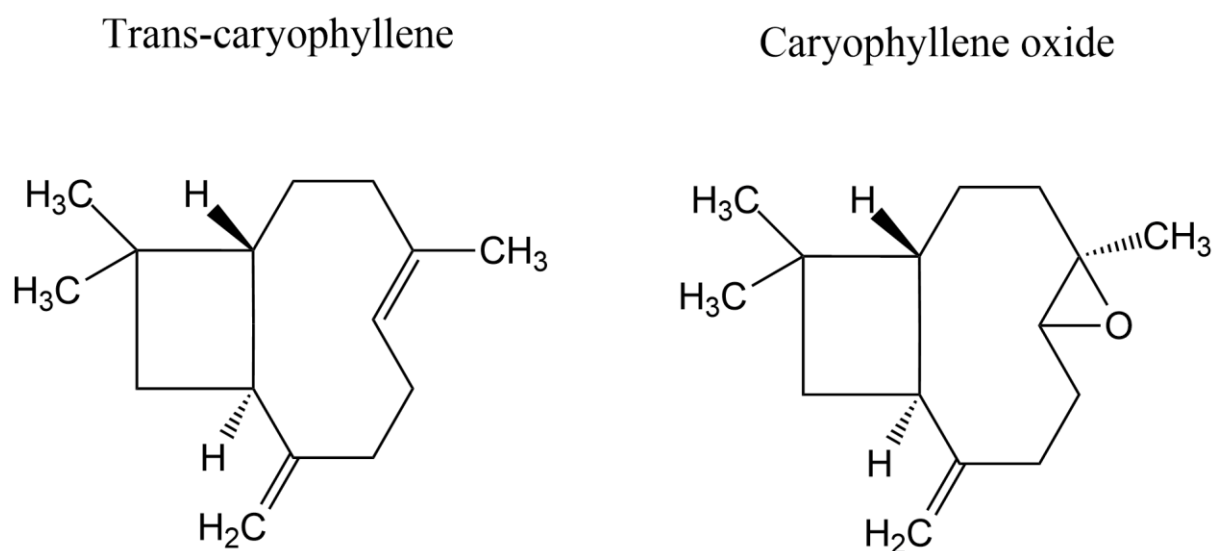


Figure 1. Chemical structures of trans-caryophyllene and caryophyllene oxide.

In addition, natural products can be encapsulated in liposomal nanoformulations, which have proven to be an option capable of facilitating the transport of poorly soluble substances in the plasma. Liposomes are spherical vesicles formed by concentric phospholipid bilayers that spontaneously form in an aqueous solution. Nanoformulations enable the use of lower drug dose, reducing the risk of adverse effects and bioaccumulation at the target site [24–26].

The encapsulation of molecules can benefit delivery and enhance the bioactivity of these organic compounds. The commonly used technique for this purpose is drug encapsulation in liposomes, which aims to improve bioavailability, enhance efficacy, and reduce side effects of therapeutic drugs. Drug encapsulation in liposomes provides better solubility of therapeutic substances, protecting them from enzymatic degradation and reducing their toxicity in healthy tissues [27–29].

Thus, this research aims to analyze the inhibition of the efflux systems NorA, Tet(K), MsrA, and MepA by the sesquiterpenes trans-caryophyllene and caryophyllene oxide, used both individually and in liposomal nanoformulations, against *S. aureus* strains.

6.2 Materials and Methods

6.2.1 Substances used in the synthesis of liposomes

For the synthesis of liposomes, the lipids 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, cholesterol, and dis-tearoylphosphatidylcholine were used. Ethanol was used as the solvent for the lipids. The lipids and sesquiterpenes trans-caryophyllene and caryophyllene oxide were obtained from Sigma-Aldrich Co., Ltd. (St. Louis, MO, USA).

6.2.2 Substances used in microbiological tests

The antibiotics norfloxacin, tetracycline, and erythromycin were used as specific substrates for strains *S. aureus* 1199B, IS-58, and RN4220, respectively. Ethidium bromide (EtBr) was used as a substrate for all three efflux pumps. The standard pump inhibitor and positive control used was 3-chlorophenylhydrazone carbonyl cyanide (CCCP). The sesquiterpenes trans-caryophyllene and caryophyllene oxide were tested. The antibiotics and sesquiterpenes were dissolved in 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) and subsequently diluted in sterile water to a concentration of 1024 µg/ml. CCCP was dissolved in a methanol/water solution at a ratio of 1:1 (v/v). EtBr was dissolved in sterile distilled water and stored at 8°C, protected from light, also at a concentration of 1024 µg/mL. The culture media used were solid Mueller-Hinton Agar (Difco™) and Brain Heart Infusion (BHI, Difco™) medium. All products were obtained from Sigma-Aldrich Co., Ltd. (St. Louis, MO, USA).

6.2.3 Synthesis of liposomes

A preliminary solution of trans-caryophyllene and caryophyllene oxide was prepared at a concentration of 50 mg/ml for subsequent encapsulation. An organic phase was prepared containing a lipid solution composed of 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC), cholesterol (CHOL), and distearoylphosphatidylcholine (DSPC) at a molar ratio of DPPC:CHOL:DSPC of 52:45:3 to achieve a final lipid concentration of 35 mM, diluted in ethanol. The microfluidic technique was employed using the NanoAssemblr Benchtop equipment (Precision Nanosystems™, Vancouver, BC, Canada) for nanoparticle fabrication. Two syringes were attached to the NanoAssemblr equipment: the left syringe contained the aqueous phase with the diluted sesquiterpene solution with a total volume of 3 ml, and the right syringe contained the lipid solution with a total volume of 1 ml. The control

nanoformulation, meaning the liposome control, was prepared only with PBS buffer added to the left syringe (aqueous solution). The resulting formulation was placed in Amicon® Ultra-15 3,000 MWCO (Merck, Darmstadt, Germany) filters and centrifuged at 3,000 rpm, 20°C for 30 minutes to remove the residual solvent. The formulations were washed with PBS buffer at pH 7.2 to remove any remaining solvent. Finally, the formulations were stored in refrigerated environment at 3°C to 8°C [30].

6.2.4 Bacterial strains

The strains of *S. aureus* used were: 1199B, expressing the NorA efflux pump; IS-58, expressing Tet(K); RN4220, expressing MsrA; and K2068, carrying MepA. These strains were provided by Prof. Glenn Kaatz (Wayne State University School of Medicine, Detroit, MI, USA) and Prof. Simon Gibbons (University College London, London, UK). One day before conducting the experiments, each strain was inoculated and grown overnight at 37°C.

6.2.5 Evaluation of the direct antibacterial activity of sesquiterpenes and nanoformulations

The reduction of the minimum inhibitory concentration (MIC) was verified. Sesquiterpenes, whether isolated or encapsulated in liposomes, were analyzed. During the experiment, broth microdilution tests were conducted using a 10% bacterial inoculum suspended in saline solution, corresponding to 0.5 on the McFarland scale. The inoculum and 900 µL of BHI culture medium were added to Eppendorf® tubes to obtain a total volume of 1 mL. A 100 µL portion of this solution was distributed into 96-well microtiter plates. Serial dilutions with the sesquiterpenes were performed. The dilutions occurred in a 1:1 ratio, with concentrations ranging from 512 µg/mL to 0.5 µg/mL. The plates were placed in a bacteriological incubator at 37 °C for 24 hours. Bacterial growth was evaluated by adding resazurin, where blue color indicated no growth and pink/red color indicated bacterial growth. The lowest concentration with no growth was considered the MIC [31,32].

6.2.6 Evaluation of efflux pump inhibitory activity by MIC reduction

This test followed the same pattern as the previous test in item 2.4 regarding the seeding, inoculum distribution in the plates, and reading. The first difference occurred in the preparation of solutions in Eppendorf tubes for subsequent distribution in the plates; the second difference occurred in the microdilution. In Eppendorf tubes, the inoculum, BHI,

sesquiterpenes, and nanoformulations were added in subinhibitory concentrations (MIC/8). After the distribution in the plates, serial microdilution was performed with antibiotics or EtBr, both at 1024 µg/mL, in combination with sesquiterpenes and nanoformulations. Specific antibiotics were used for each strain. Norfloxacin was used against 1199B, tetracycline against IS-58, and erythromycin against RN4220. As a negative control, antibiotics or EtBr alone were used. CCCP, the standard efflux pump inhibitor, was used at MIC/8 of each strain. The plates were then placed in a bacteriological incubator, and the readings were performed [31,32].

6.2.7 Evaluation of efflux pump inhibition through the measurement of EtBr fluorescence emission

For this test the substances that showed the best results in previous tests were selected. The *S. aureus* K2068 strain was seeded on solid Mueller-Hinton Agar medium 24 hours before the experiment and kept in a bacteriological incubator at 37°C. The inoculum was prepared in phosphate-buffered saline (PBS) buffer until reaching a colony-forming unit (CFU) count of 1.5×10^8 . In Eppendorf tubes, a solution containing PBS with *S. aureus* K2068 inoculum was prepared. Trans-caryophyllene and caryophyllene oxide (100 µg/mL), were then added to the solution. CCCP at 50 µg/mL was used as the positive control, and the negative control consisted of only the inoculum + EtBr. The solutions were incubated for 1 hour and 30 minutes, followed by the addition of EtBr at 100 µg/mL to all solutions except the growth control. The solutions were incubated for an additional 1 hour, then centrifuged at 10,000 rpm for 2 minutes, and washed twice with PBS to remove EtBr and any supernatant substances. The formed pellet was homogenized and distributed in microplates. The readings were performed using fluorescence microplate reader (Cytation 1, BioTek®, Winooski, VT, USA) and Gen5™ 3.22 Software, with excitation at 530 nm and emission wavelength at 590 nm. The following groups were read: inoculum alone as the growth control, inoculum + EtBr as the negative control, inoculum + EtBr + CCCP as the positive control, inoculum + EtBr + trans-caryophyllene at 100 µg/mL, and inoculum + EtBr + caryophyllene oxide at 100 µg/mL. The assay was conducted in triplicate. [33,34].

6.2.8 Statistical analysis

The microbiological results were expressed as geometric mean and standard deviation. The analysis was conducted using One-way ANOVA, followed by the Dunnett test. Results were considered significant when $p < 0.05$ in comparison to the control. GraphPad Prism 5.0 software was employed for the analysis. The assays were conducted in triplicate.

6.3 Results

6.3.1 Physical-chemical profile of liposomes

The physical-chemical characterization of the liposomes consisted of determining the average size, intensity, Zeta potential, concentration, PDI (Polydispersity Index), and encapsulation efficiency. The nanoformulations showed an average size of 184.8 nm and 193.6 nm, respectively for trans-caryophyllene and caryophyllene oxide, with an intensity of 3 a.u. Both had a Zeta potential of -14.5 mV and -18.8 mV, respectively, a concentration of 6.62×10^8 particles/ml and 6.9×10^8 particles/ml, a polydispersity index of 0.42 and 0.96, and an encapsulation efficiency of 88% and 85%, respectively (Table 1).

Table 1. Physicochemical characteristics of the liposomal nanoformulations containing trans-caryophyllene and caryophyllene oxide.

	Liposome/trans-caryophyllene	Liposome/caryophyllene oxide
Size	184.8 nm	193.6 nm
Intensity	3 a.u.	3 a.u.
Zeta potential	-14.5 mV	-18.8 mV
pH	7.4	7.4
Concentration	6.62×10^8 particles/ml	6.9×10^8 particles/ml
Polydispersity index (PDI)	0.42	0.96
Encapsulation efficiency	88%	85%

6.3.2 Evaluation of the direct antibacterial activity of sesquiterpenes and nanoformulations

Trans-caryophyllene did not show direct antibacterial action against the tested *S. aureus* strains. On the other hand, caryophyllene oxide exhibited direct antibacterial activity against *S. aureus* 1199B and RN4220 strains, with MICs of 512 µg/mL and 406.4 µg/mL, respectively. However, the liposomal nanoformulations did not demonstrate clinically relevant antibacterial activity, as evidenced by MIC values > 1024 µg/mL for all tested strains (Table 2).

Table 2. Evaluation of the in vitro antibacterial activity of the sesquiterpenes trans-caryophyllene, caryophyllene oxide, and the liposomal nanoformulations containing trans-caryophyllene and caryophyllene oxide.

	<i>S. aureus</i> 1199B	<i>S. aureus</i> IS-58/	<i>S. aureus</i> RN4220/
Control	128 µg/ml (Norfloxacin)	32 µg/ml (Tetracyclin)	32 µg/ml (Erythromycin)
Trans-caryophyllene	> 1024 µg/ml	> 1024 µg/ml	> 1024 µg/ml
Caryophyllene oxide	512 µg/ml*	> 1024 µg/mL	406.4 µg/ml*
Liposome/Trans-caryophyllene	> 1024 µg/mL	> 1024 µg/mL	> 1024 µg/ml
Liposome/Caryophyllene oxide	> 1024 µg/ml	> 1024 µg/ml	> 1024 µg/ml

* Clinically relevant antibacterial activity.

6.3.3 Evaluation of efflux pump inhibitory activity by MIC reduction

In the presence of the *S. aureus* 1199B strain carrying the NorA efflux pump, both trans-caryophyllene and caryophyllene oxide, when used individually, reduced the MIC of norfloxacin by 37%. However, when encapsulated in liposomes, they did not show any potentiating effects (Figure 2A). In combination with EtBr, both sesquiterpenes, when used individually, reduced the MIC by 50% compared to the control. The Lipo/caryophyllene oxide reduced the MIC of EtBr by 37%. Moreover, Lipo/caryophyllene oxide exhibited a 50% higher potentiating effect than the liposome control. The standard efflux pump inhibitor, CCCP, showed a significant synergistic effect in all combinations, indicating reproducibility of the experiment (Figure 2B). These results suggest that the individual sesquiterpenes may

enhance the action of fluoroquinolones and inhibit the NorA efflux pumps. Additionally, caryophyllene oxide encapsulated in liposomes may also act as a putative inhibitor of the NorA efflux pump.

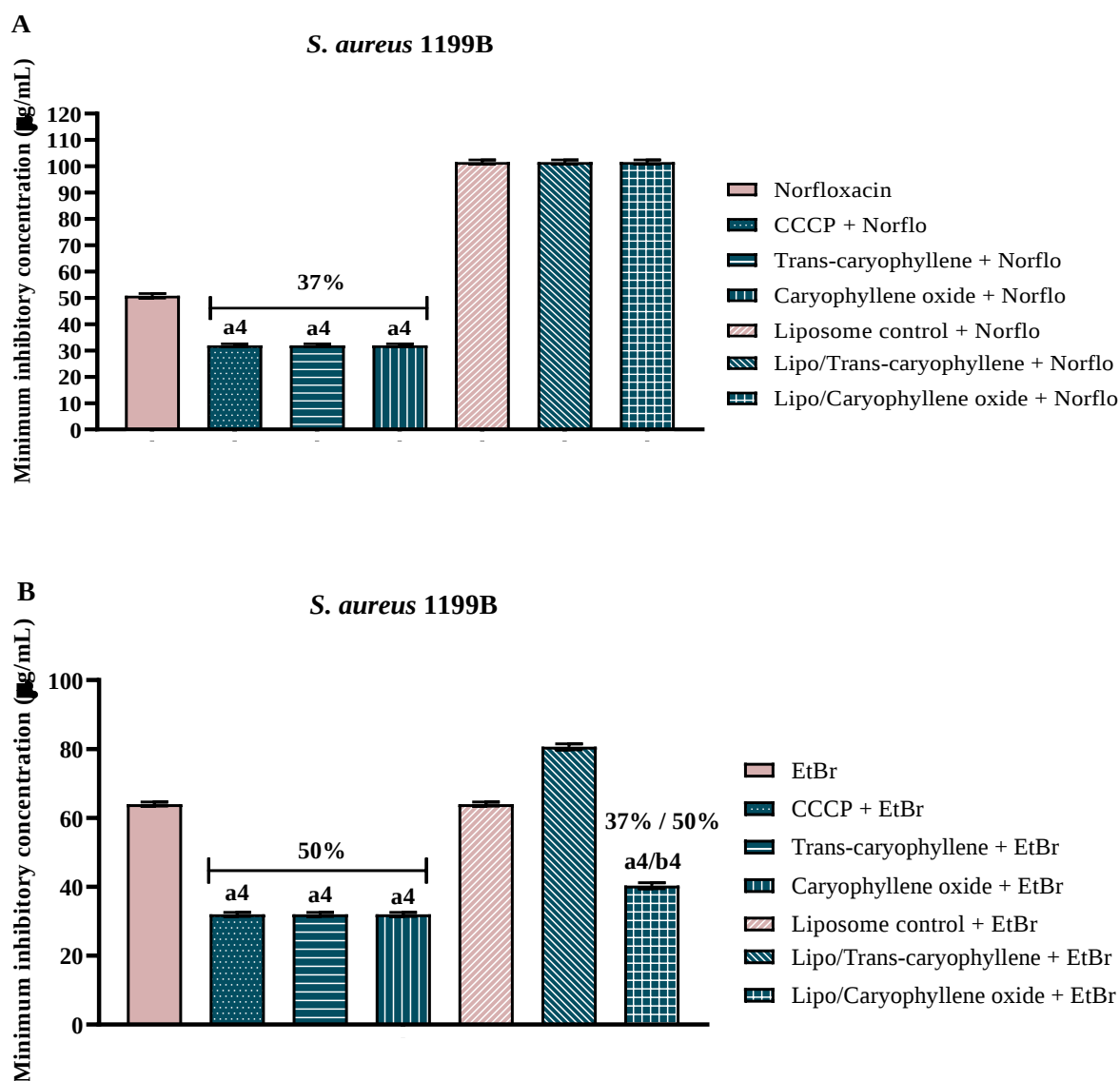


Figure 2. Inhibitory action of the NorA efflux pump by trans-caryophyllene and caryophyllene oxide, either isolated or encapsulated in liposomes, against the *S. aureus* 1199B strain. Associated with norfloxacin **(A)** and ethidium bromide **(B)**. Two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc. CCCP = Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone; EtBr = ethidium bromide; a4 = $P < 0.0001$ vs control norfloxacin or ethidium bromide; b4 = $P < 0.0001$ vs liposome control, in MIC reduction.

Against the *S. aureus* IS-58 strain carrying the Tet(K) efflux pump, none of the groups with sesquiterpenes showed potentiating effects of tetracycline (Figure 3A). However, when combined with EtBr, trans-caryophyllene and caryophyllene oxide reduced the MIC by 39% and 60%, respectively. The groups encapsulated in liposomes did not show significant effects (Figure 3B). These results indicate that the individual sesquiterpenes can inhibit the Tet(K) efflux pumps, but they do not potentiate the action of tetracyclines.

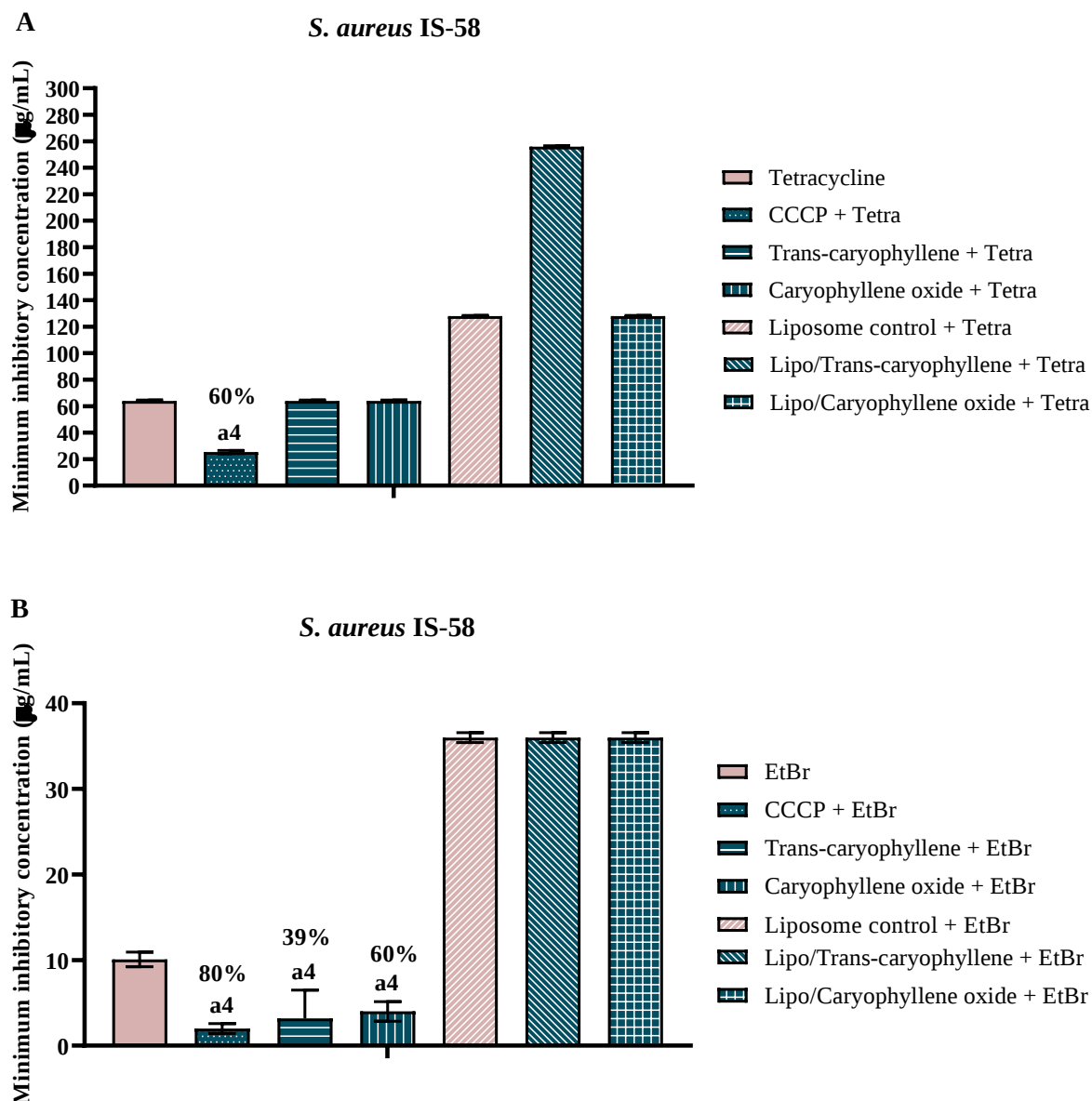
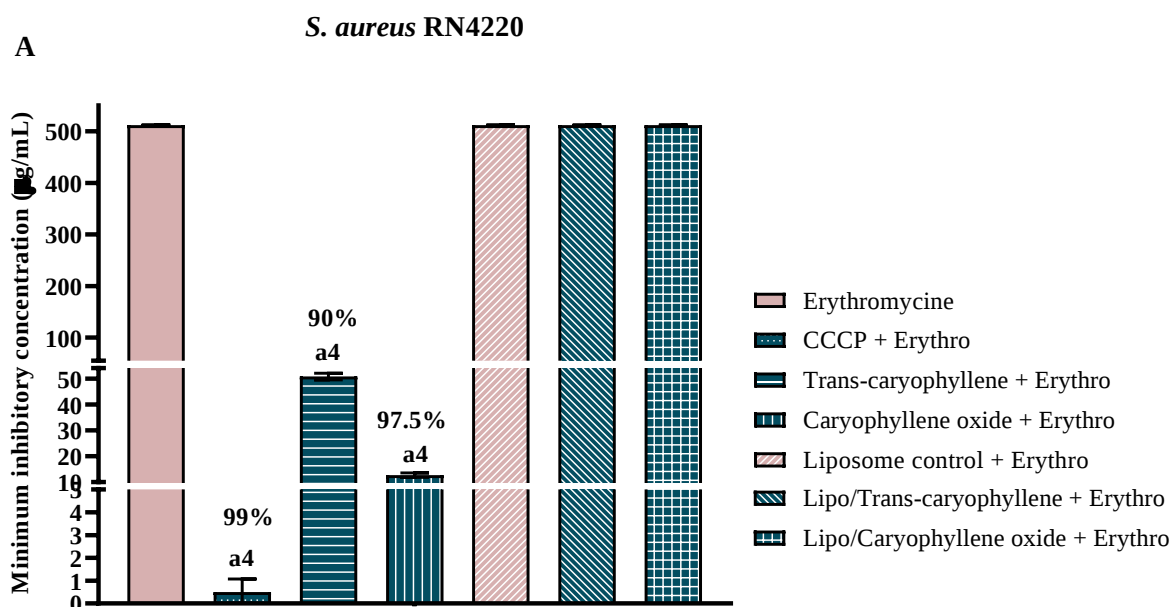


Figure 3. Inhibitory action of the Tet(K) efflux pump by trans-caryophyllene and caryophyllene oxide, either isolated or encapsulated in liposomes, against the *S. aureus* IS-58 strain. Associated with tetracycline **(A)** and ethidium bromide **(B)**. Two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc. CCCP = Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone; EtBr

= ethidium bromide; a4 = $P < 0.0001$ vs control tetracycline or ethidium bromide, in MIC reduction

Against the *S. aureus* RN4220 strain carrying the MsrA efflux pump, both trans-caryophyllene and caryophyllene oxide, when used individually, reduced the MIC of erythromycin by 90% and 97.5%, respectively (Figure 4A). When combined with EtBr, trans-caryophyllene reduced the MIC by 52% compared to EtBr alone. The groups liposomes did not show significant effects on potentiation (Figure 4B). These results indicate that trans-caryophyllene when used individually, can act as an efficient MsrA inhibitor. It is also suggested that these individual sesquiterpenes may enhance the action of macrolides.



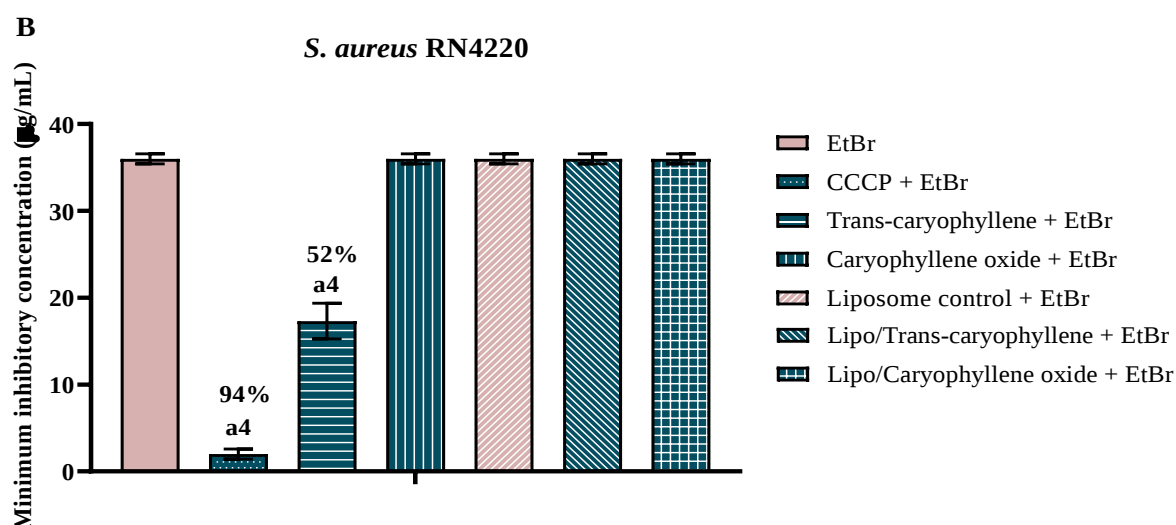


Figure 4. Inhibitory action of the MsrA efflux pump by trans-caryophyllene and caryophyllene oxide, either isolated or encapsulated in liposomes, against the *S. aureus* RN4220 strain. Associated with erythromycine **(A)** and ethidium bromide **(B)**. Two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc. CCCP = Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone; EtBr = ethidium bromide; a4 = $P < 0.0001$ vs control erythromycine or ethidium bromide, in MIC reduction

6.3.4 Evaluation of efflux pump inhibition through the measurement of EtBr fluorescence emission

Upon evaluating the fluorescence emission of the *S. aureus* K2068 strain, it was observed that trans-caryophyllene and caryophyllene oxide at a concentration of 100 µg/mL increased fluorescence by 18% and 23%, respectively, compared to the negative control (EtBr). A significant result was also observed with the pump inhibitor CCCP, showing a 43% increase in fluorescence, indicating experiment reproducibility (Figure 5).

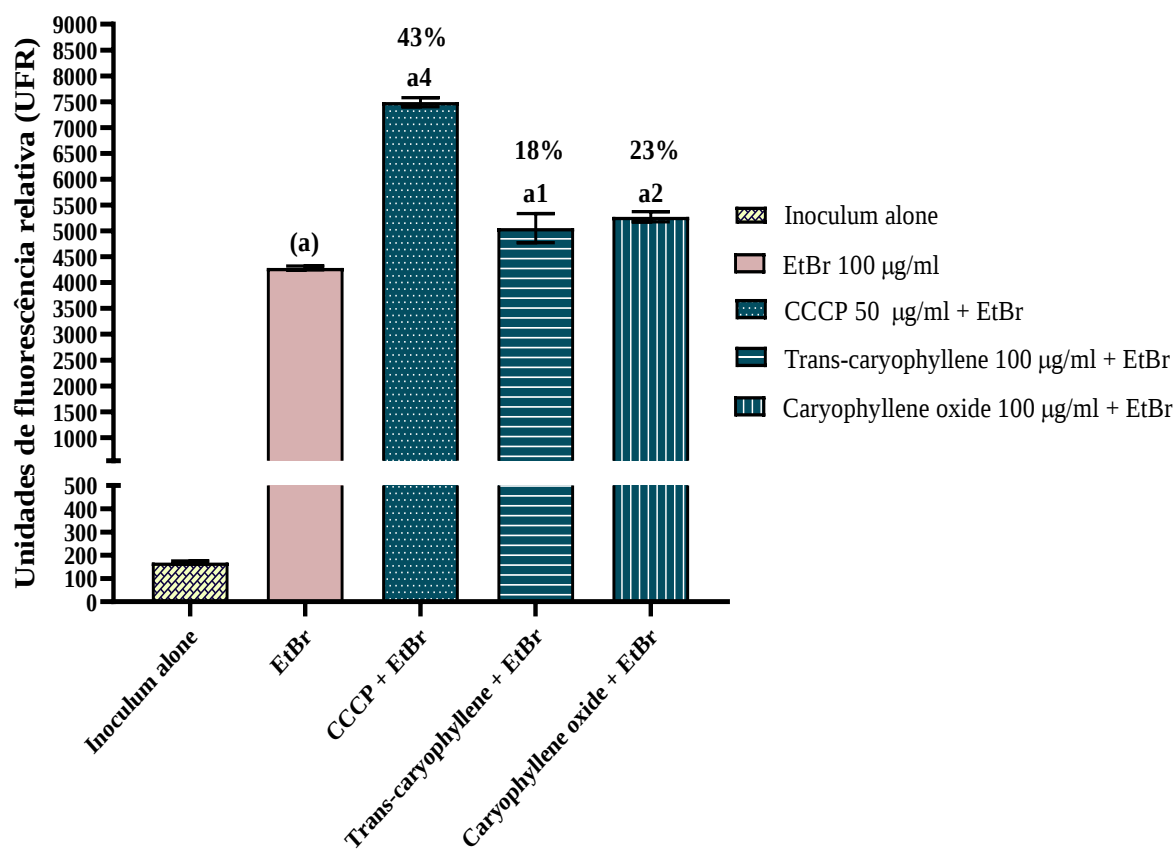


Figure 5. Evaluation of fluorescence emission and inhibition of the MepA efflux pump treated with trans-caryophyllene and caryophyllene oxide, against the *S. aureus* K2068. One-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc. CCCP = Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazine; EtBr = ethidium bromide; Inoc = inoculum; a1 = $p < 0.05$ vs EtBr; a2 = $p < 0.01$ vs EtBr; a4 = $P < 0.0001$ vs EtBr.

6.4 Discussion

The liposome's average size, ranging from 184.8 nm to 193.6 nm, plays a pivotal role in drug delivery applications. Smaller sizes, as observed in the liposome formulations, are generally favored as they can enhance the bioavailability of encapsulated compounds and improve cellular penetration. This is attributed to the increased likelihood of smaller particles crossing biological barriers and reaching their therapeutic targets. Approaching liposome particle sizes around 100 nm, as seen in the trans-caryophyllene formulation, is particularly relevant because the formulation can be more effective in delivering its active compounds, leading to superior therapeutic outcomes [35].

The Zeta potential, ranging from -14.5 mV to -18.8 mV in the formulations, serves as an indicator of particle charge and colloidal stability. Values further from zero indicate more suspension stability. Significant zeta potential values, as observed in the trans-caryophyllene and caryophyllene oxide formulations, suggest good colloidal stability. This is crucial for preventing particle aggregation, ensuring they remain dispersed and effective over time [36,37].

The concentration of liposome particles, varying from 6.62×10^8 to 6.9×10^8 particles/ml, influences the dosage of the formulations and their effectiveness in delivering active compounds. Higher concentrations can enhance delivery efficacy but may also affect toxicity. Thus, the capacity to control concentration is an advantage, enabling dosage adjustments as necessary [38].

The PDI is related to the size distribution of the particle within a given sample. This value indicates the homogeneity of the system. The lower the PDI value, the higher the degree of homogeneity of the sample. Therefore, the sample containing a formulation with trans-caryophyllene showed greater homogeneity [39].

Encapsulation efficiency is a critical parameter, and higher values of encapsulation efficiency, such as 88% for trans-caryophyllene, signify a greater amount of the active compound being enclosed within the liposome particles. This is highly desirable in therapeutic applications since it means a substantial portion of the active compound is precisely delivered to the site of action, optimizing efficacy [40].

The reduction in MIC of the antibiotic or EtBr after association with the tested substances against efflux pump-carrying strains is indicative of the efflux pump inhibition. Additionally, it suggests the potential enhancement of the antibiotic's action [41–49]. In summary, the presented results indicate that trans-caryophyllene and caryophyllene oxide, when used individually, may act as potential inhibitors of NorA, Tet(K), and MsrA. Encapsulated caryophyllene oxide may also act in the inhibition of NorA. The insignificance of the other liposome results with sesquiterpenes may be due to the difference between the liposome's lipid composition and the bacterial membrane, which could interfere with the outcome. The main phospholipids of the *S. aureus* membrane are phosphatidylglycerol, lysyl-phosphatidylglycerol, cardiolipin, and glycopospholipids [50–53].

A study conducted with the essential oil of *Piper caldense*, containing Caryophyllene oxide as the major constituent, and trans-Caryophyllene, reported the inhibitory action on the NorA, MepA, and QacC efflux pumps by the essential oil. Suggesting that these sesquiterpenes may have influenced the inhibitory action of the essential oil [54].

Rhus albida essential oil presented the major constituents: caryophyllene oxide and caryophyllene. In this study, Elhidar and colleagues [55] demonstrated a synergistic action of the essential oil with ciprofloxacin against *S. aureus* 1199 and 1199B strains carrying NorA. It also caused an increase in intracellular accumulation of EtBr caused by *R. albida*, indicating inhibition of the NorA efflux pump.

The essential oil of *Aloysia gratissima* containing caryophyllene oxide and beta-caryophyllene potentiated the antibacterial action of norfloxacin against *S. aureus*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*. Additionally, the beta-caryophyllene isomer reduced the MIC of norfloxacin, ciprofloxacin, and EtBr against the 1199B and K2068 strains. These findings support the results of the present study [56].

The β -caryophyllene oxide inhibited MDR1 and MRP1/2 activity (ABC export pumps) in human hepatoma Alexander cells. These results indicate that sesquiterpenes such as caryophyllene oxide are promising targets for further studies in combating chemotherapy resistance in eukaryotic cells [57].

The increase in fluorescence indicates inhibition of the MepA efflux pump. EtBr is a DNA intercalating agent that emits fluorescence when intercalated into the bacterial genome. Therefore, the more the efflux pump is inhibited, the greater the increase in intracellular EtBr concentration and consequent emission of EtBr fluorescence. The inhibitory effect of the efflux pump was supported by the fluorimetry result [58–60].

In the present study, it can be seen that the sesquiterpenes trans-caryophyllene and caryophyllene oxide when nanoencapsulated do not present suggestive results in relation to the therapeutic effect of reducing MIC, often increasing the concentration. This is due to the lipid-soluble composition of sesquiterpenes that can interact with the cell wall of gram-positive bacteria, which has a thick layer of peptidoglycan that is water-soluble in nature. According to Andrade and Coutinho [61], studies report that less polar compounds are more effective against Gram-positive and Gram-negative bacteria, due to the presence of polysaccharide chains, which act as a barrier to active hydrophobic compounds in the membrane.

6.5 Conclusion

Therefore, trans-caryophyllene and caryophyllene oxide possibly act as inhibitors of the NorA, Tet(K), MsrA, and MepA efflux pumps in resistant *S. aureus* strains. Further

studies are required to describe the molecular targets involved in the action of these organic compounds.

Funding

The research was funded by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), and Cearense Foundation for Scientific and Technological Development (FUNCAP) under protocol number: DCT-0182-00104.02.00/21 and 04855159/2022.

CRediT authorship contribution statement

Jorge E. G. Santana: Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Methodology, Investigation, Formal analysis. **Cícera D. de M. Oliveira-Tintino:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Project administration, Writing - review & editing. **Gabriel G. Alencar:** Investigation, Methodology. **Gustavo M. Siqueira:** Investigation, Methodology. **José W. Almeida-Bezerra:** Writing – review & editing. **João P. V. Rodrigues:** Investigation, Methodology. **Vanessa B. P. Gonçalves:** Investigation, Methodology. **Roberto Nicolete:** Funding acquisition, Investigation, Supervision, Validation. **Saulo R. Tintino:** Investigation, Methodology. **Henrique D. M. Coutinho:** Conceptualization, Funding acquisition, Project administration, Supervision, Validation, Visualization. **Teresinha G. da Silva:** Conceptualization, Funding acquisition, Project administration, Supervision, Validation, Visualization.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

Federal University of Pernambuco (UFPE), Regional University of Cariri (URCA), and Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz Ceará).

References

- [1] M.A. Abushaheen, A.J. Fatani, M. Alosaimi, W. Mansy, M. George, S. Acharya, S. Rathod, D.D. Divakar, C. Jhugroo, S. Vellappally, Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance, *Disease-a-Month*. 66 (2020) 100971.
- [2] W.H.O. WHO, Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) Report: Early Implementation 2020, 2020.
- [3] K. Arteaga-Livias, K. Pinzas-Acosta, L. Perez-Abad, V. Panduro-Correa, A.A. Rabaan, S. Pecho-Silva, B. Dámaso-Mata, A multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* outbreak in a Peruvian hospital: Another threat from the COVID-19 pandemic, *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 43 (2022) 267–268. <https://doi.org/10.1017/ICE.2020.1401>.
- [4] T.L. Wiemken, R.R. Kelley, The Annual Review of Public Health is online at, *Annu. Rev. Public Heal.* 41 (2020) 21–36. <https://doi.org/10.1146/annurev-publhealth>.
- [5] M.A.N. Diaz, C.C. Rossi, V.R. Mendonça, D.M. Silva, A.O.B. de Ribon, A.P. Aguilar, G.D. Muñoz, Screening of medicinal plants for antibacterial activities on *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis, *Rev. Bras. Farmacogn.* 20 (2010) 724–728. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010005000013>.
- [6] D.Y. Gong, X.Y. Chen, S.X. Guo, B.C. Wang, B. Li, Recent advances and new insights in biosynthesis of dendrobine and sesquiterpenes, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 105 (2021) 6597–6606. <https://doi.org/10.1007/S00253-021-11534-1/METRICS>.
- [7] J. Espinoza, A. Urzúa, L. Sanhueza, M. Walter, P. Fincheira, P. Muñoz, L. Mendoza, M. Wilkens, Essential oil, extracts, and sesquiterpenes obtained from the heartwood of *Pilgerodendron uviferum* act as potential inhibitors of the *Staphylococcus aureus* NorA multidrug efflux pump, *Front. Microbiol.* 10 (2019) 433735. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.00337/BIBTEX>.
- [8] R.P. da Cruz, T.S. de Freitas, M.D.S. Costa, A.T.L. Dos Santos, F.F. Campina, R.L.S. Pereira, J.W.A. Bezerra, L.J. Quintans-Júnior, A.A.D.S. Araújo, J.P. De Siqueira Júnior, M. Iriti, E.M. Varoni, I.R.A. De Menezes, H.D.M. Coutinho, M.F.B. Morais-Braga, Effect of α -Bisabolol and Its β -Cyclodextrin Complex as TetK and NorA Efflux Pump Inhibitors in *Staphylococcus aureus* Strains, *Antibiot.* 2020, Vol. 9, Page 28. 9 (2020) 28. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS9010028>.
- [9] A. Judzientiene, J. Budiene, R. Butkiene, E. Kupcinskiene, I. Laffont-Schwob, V. Masotti, Caryophyllene Oxide-rich Essential Oils of Lithuanian *Artemisia campestris* ssp. *campestris* and Their Toxicity, <https://doi.org/10.1177/1934578X1000501232>. 5 (2010) 1981–1984. <https://doi.org/10.1177/1934578X1000501232>.
- [10] L. Monzote, W. Stamberg, K. Staniek, L. Gille, Toxic effects of carvacrol, caryophyllene oxide, and ascaridole from essential oil of *Chenopodium ambrosioides* on mitochondria, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 240 (2009) 337–347. <https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2009.08.001>.
- [11] R. De Oliveira Portella, R. Facanali, M.O.M. Marques, L.F. Rolim De Almeida, Chemical composition of essential oils from the vegetative and reproductive structures of *Copaifera langsdorffii* Desf., *Nat. Prod. Res.* 29 (2015) 874–878. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.987145>.
- [12] E.S. Fernandes, G.F. Passos, R. Medeiros, F.M. da Cunha, J. Ferreira, M.M. Campos, L.F. Pianowski, J.B. Calixto, Anti-inflammatory effects of compounds α -humulene and (–)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*, *Eur. J. Pharmacol.* 569 (2007) 228–236. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2007.04.059>.
- [13] M.B. Hassanpouraghdam, A. Hassani, M.S. Shalamzari, Menthone- and estragole-rich essential oil of cultivated *Ocimum basilicum* L. from Northwest Iran, *Chemija*. 21

- (2010) 59–62.
- [14] L.A. Galindo, A. De Moraes Pultrini, M. Costa, Biological effects of *Ocimum gratissimum* L. are due to synergic action among multiple compounds present in essential oil, *J. Nat. Med.* 64 (2010) 436–441. <https://doi.org/10.1007/s11418-010-0429-2>.
 - [15] M. Asadi, A. History, Chemical constituents of the essential oil isolated from seed of black pepper, *Piper nigrum* L., (Piperaceae) ARTICLE INFO ABSTRACT, *Int. J. Plant Bas. Pharm.* 2 (2022) 25–29. <https://ijpbp.com>.
 - [16] K. Jassal, S. Kaushal, Rashmi, R. Rani, Antifungal potential of guava (*Psidium guajava*) leaves essential oil, major compounds: beta-caryophyllene and caryophyllene oxide, *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* 54 (2021) 2034–2050. <https://doi.org/10.1080/03235408.2021.1968287>.
 - [17] S. Ikawati, T. Himawan, A.L. Abadi, H. Tarno, A. Fajarudin, In Silico Study of Eugenol and Trans-Caryophyllene also Clove Oil Fumigant Toxicity on *Tribolium castaneum*, *J. Trop. Life Sci.* 12 (2022) 339–349. <https://doi.org/10.11594/jtls.12.03.07>.
 - [18] J. Novak, K. Zitterl-Eglseer, S.G. Deans, C.M. Franz, Essential oils of different cultivars of *Cannabis sativa* L. and their antimicrobial activity, *Flavour Fragr. J.* 16 (2001) 259–262. <https://doi.org/10.1002/FFJ.993>.
 - [19] B.D. Zellner, A.C.L. Amorim, A.L.P. de Miranda, R.J.V. Alves, J.P. Barbosa, G.L. da Costa, C.M. Rezende, Screening of the odour-activity and bioactivity of the essential oils of leaves and flowers of *Hyptis Passerina* Mart. from the Brazilian Cerrado, *J. Braz. Chem. Soc.* 20 (2009) 322–332. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532009000200018>.
 - [20] M.D. Guillén, N. Cabo, J. Burillo, Characterisation of the essential oils of some cultivated aromatic plants of industrial interest, *J. Sci. Food Agric.* 70 (1996) 359–363. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199603\)70:3<359::AID-JSFA512>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199603)70:3<359::AID-JSFA512>3.0.CO;2-0).
 - [21] H. Liu, Z. Song, D. Liao, T. Zhang, F. Liu, K. Zhuang, K. Luo, L. Yang, Neuroprotective Effects of Trans-Caryophyllene Against Kainic Acid Induced Seizure Activity and Oxidative Stress in Mice, *Neurochem. Res.* 40 (2015) 118–123. <https://doi.org/10.1007/S11064-014-1474-0/METRICS>.
 - [22] H. Coté, M.-A. Boucher, A. Pichette, J. Legault, Anti-Inflammatory, Antioxidant, Antibiotic, and Cytotoxic Activities of *Tanacetum vulgare* L. Essential Oil and Its Constituents, *Med.* 2017, Vol. 4, Page 34. 4 (2017) 34. <https://doi.org/10.3390/MEDICINES4020034>.
 - [23] H. Ullah, A. Di Minno, C. Santarcangelo, H. Khan, M. Daglia, Improvement of Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction by β -Caryophyllene: A Focus on the Nervous System, *Antioxidants* 2021, Vol. 10, Page 546. 10 (2021) 546. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX10040546>.
 - [24] M. Alavi, R. Yarani, M. Sreedharan, S. Thomas, Micro and nanoformulations of catechins for therapeutic applications: recent advances and challenges, *Micro Nano Bio Asp.* 2 (2023) 8–19. <https://doi.org/10.22034/MNBA.2023.382922.1021>.
 - [25] C. Liu, S. Dong, X. Wang, H. Xu, X. Yang, S. Wu, X. Jiang, M. Kan, C. Xu, Research progress of polyphenols in nanoformulations for antibacterial application, *Mater. Today Bio.* 21 (2023) 100729. <https://doi.org/10.1016/J.MTBIO.2023.100729>.
 - [26] H. Nsairat, W. Alshaer, F. Odeh, E. Esawi, D. Khater, A. Al Bawab, M. El-Tanani, A. Awidi, M.S. Mubarak, Recent advances in using liposomes for delivery of nucleic acid-based therapeutics, *OpenNano.* 11 (2023) 100132. <https://doi.org/10.1016/J.ONANO.2023.100132>.
 - [27] A. Gonzalez Gomez, Z. Hosseinidoust, Liposomes for Antibiotic Encapsulation and

- Delivery, *ACS Infect. Dis.* 6 (2020) 896–908.
https://doi.org/10.1021/ACSINFECDIS.9B00357/ASSET/IMAGES/MEDIUM/ID9B00357_0010.GIF.
- [28] J.P. Colletier, B. Chaize, M. Winterhalter, D. Fournier, Protein encapsulation in liposomes: Efficiency depends on interactions between protein and phospholipid bilayer, *BMC Biotechnol.* 2 (2002) 1–8. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-2-9/FIGURES/8>.
- [29] G. Liu, S. Hou, P. Tong, J. Li, Liposomes: Preparation, Characteristics, and Application Strategies in Analytical Chemistry, <https://doi.org/10.1080/10408347.2020.1805293>. 52 (2020) 392–412.
<https://doi.org/10.1080/10408347.2020.1805293>.
- [30] N.B. Barros, V. Migliaccio, V.A. Facundo, P. Ciancaglini, R.G. Stábeli, R. Nicolete, I. Silva-Jardim, Liposomal-lupane system as alternative chemotherapy against cutaneous leishmaniasis: Macrophage as target cell, *Exp. Parasitol.* 135 (2013) 337–343.
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.07.022>.
- [31] CLSI, CLSI, M100ED29E. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 29th Informational Supplement. 20, 29th ed., 2019.
- [32] C.D. de M. Oliveira-Tintino, S.R. Tintino, D.F. Muniz, C.R. dos S. Barbosa, R.L.S. Pereira, I.M. Begnini, R.A. Rebelo, L.E. da Silva, S.L. Mireski, M.C. Nasato, M.I. Lacowicz Krautler, P.S. Pereira, A.M.R. Teixeira, I.R.A. de Menezes, H.D.M. Coutinho, T.G. da Silva, Do 1,8-naphthyridine sulfonamides possess an inhibitory action against Tet(K) and MsrA efflux pumps in multiresistant *Staphylococcus aureus* strains?, *Microb. Pathog.* 147 (2020).
<https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2020.104268>.
- [33] S. Pal, A. Misra, S. Banerjee, B. Dam, Adaptation of ethidium bromide fluorescence assay to monitor activity of efflux pumps in bacterial pure cultures or mixed population from environmental samples, *J. King Saud Univ. - Sci.* 32 (2020) 939–945.
<https://doi.org/10.1016/J.JKSUS.2019.06.002>.
- [34] C.D. de M. Oliveira-Tintino, J.E.G. Santana, G.G. Alencar, G.M. Siqueira, S.A. Gonçalves, S.R. Tintino, I.R.A. de Menezes, J.P.V. Rodrigues, V.B.P. Gonçalves, R. Nicolete, J. Ribeiro-Filho, T.G. da Silva, H.D.M. Coutinho, Valencene, Nootkatone and Their Liposomal Nanoformulations as Potential Inhibitors of NorA, Tet(K), MsrA, and MepA Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus* Strains, *Pharm.* 2023, Vol. 15, Page 2400. 15 (2023) 2400. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS15102400>.
- [35] J.M. Caster, S.K. Yu, A.N. Patel, N.J. Newman, Z.J. Lee, S.B. Warner, K.T. Wagner, K.C. Roche, X. Tian, Y. Min, A.Z. Wang, Effect of particle size on the biodistribution, toxicity, and efficacy of drug-loaded polymeric nanoparticles in chemoradiotherapy, *Nanomedicine.* 13 (2017) 1673. <https://doi.org/10.1016/J.NANO.2017.03.002>.
- [36] S. Honary, F. Zahir, Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 2), *Trop. J. Pharm. Res.* 12 (2013) 265–273.
<https://doi.org/10.4314/tjpr.v12i2.20>.
- [37] M.C. Smith, R.M. Crist, J.D. Clogston, S.E. McNeil, Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes, *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 5779–5787.
<https://doi.org/10.1007/S00216-017-0527-Z/METRICS>.
- [38] S. Wilhelm, A.J. Tavares, Q. Dai, S. Ohta, J. Audet, H.F. Dvorak, W.C.W. Chan, Analysis of nanoparticle delivery to tumours, *Nat. Rev. Mater.* 2016 15. 1 (2016) 1–12.
<https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.14>.
- [39] L. Dantas Martins, J. Otaviano Praça de Souza, Caracterização morfológica e granulométrica de depósitos aluviais semiáridos, *Rev. Geociências Do Nord.* 2 (2016) 63–72. <https://doi.org/10.21680/2447-3359.2016V2N0ID10425>.

- [40] S.G.M. Ong, L.C. Ming, K.S. Lee, K.H. Yuen, Influence of the encapsulation efficiency and size of liposome on the oral bioavailability of griseofulvin-loaded liposomes, *Pharmaceutics*. 8 (2016). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics8030025>.
- [41] G.W. Kaatz, V. V. Moudgal, S.M. Seo, J.E. Kristiansen, Phenothiazines and thioxanthenes inhibit multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus*, *Antimicrob. Agents Chemother.* (2003). <https://doi.org/10.1128/AAC.47.2.719-726.2003>.
- [42] B.D. Schindler, P. Jacinto, G.W. Kaatz, Inhibition of drug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: Current status of potentiating existing antibiotics, *Future Microbiol.* (2013). <https://doi.org/10.2217/fmb.13.16>.
- [43] C.E. DeMarco, L.A. Cushing, E. Frempong-Manso, S.M. Seo, T.A.A. Jaravaza, G.W. Kaatz, Efflux-related resistance to norfloxacin, dyes, and biocides in bloodstream isolates of *Staphylococcus aureus*, *Antimicrob. Agents Chemother.* (2007). <https://doi.org/10.1128/AAC.00430-07>.
- [44] S. Costa, C. Falcão, M. Viveiros, D. MacHado, M. Martins, J. Melo-Cristino, L. Amaral, I. Couto, Exploring the contribution of efflux on the resistance to fluoroquinolones in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, *BMC Microbiol.* (2011). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-241>.
- [45] J.E. Kristiansen, V.F. Thomsen, A. Martins, M. Viveiros, L. Amaral, Non-antibiotics reverse resistance of bacteria to antibiotics, In *Vivo* (Brooklyn). (2010).
- [46] D. Patel, C. Kosmidis, S.M. Seo, G.W. Kaatz, Ethidium bromide MIC screening for enhanced efflux pump gene expression or efflux activity in *Staphylococcus aureus*, *Antimicrob. Agents Chemother.* (2010). <https://doi.org/10.1128/AAC.01058-10>.
- [47] L.J.V. Piddock, Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria, *Clin. Microbiol. Rev.* (2006). <https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.382-402.2006>.
- [48] R.M.A. El-Baky, T. Sandle, J. John, G.E.D.A. Abuo-Rahma, H.F. Hetta, A novel mechanism of action of ketoconazole: Inhibition of the nora efflux pump system and biofilm formation in multidrug-resistant *staphylococcus aureus*, *Infect. Drug Resist.* (2019). <https://doi.org/10.2147/IDR.S201124>.
- [49] C. Ramalhete, G. Spengler, A. Martins, M. Martins, M. Viveiros, S. Mulhovo, M.J.U. Ferreira, L. Amaral, Inhibition of efflux pumps in meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* resistant strains by triterpenoids from *Momordica balsamina*, in: *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.09.011>.
- [50] D.C. White, F.E. Frerman, Extraction, characterization, and cellular localization of the lipids of *Staphylococcus aureus*, *J. Bacteriol.* 94 (1967) 1854–1867. <https://doi.org/10.1128/JB.94.6.1854-1867.1967>.
- [51] Y. Oku, K. Kurokawa, N. Ichihashi, K. Sekimizu, Characterization of the *Staphylococcus aureus* mprF gene, involved in lysinylation of phosphatidylglycerol, *Microbiology*. 150 (2004) 45–51. <https://doi.org/10.1099/MIC.0.26706-0>.
- [52] C. Sohlenkamp, O. Geiger, Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways, *FEMS Microbiol. Rev.* 40 (2016) 133–159. <https://doi.org/10.1093/FEMSRE/FUV008>.
- [53] S. Kuhn, C.J. Slavetinsky, A. Peschel, Synthesis and function of phospholipids in *Staphylococcus aureus*, *Int. J. Med. Microbiol.* 305 (2015) 196–202. <https://doi.org/10.1016/J.IJMM.2014.12.016>.
- [54] A.L.A.B. Leal, C.F. Bezerra, C. Confortin, L.E. da Silva, E.M. Marinho, M.M. Marinho, M.A. Vasconcelos, T.G. da Silva, E.S. Marinho, A.M.R. Teixeira, H.D.M. Coutinho, H.M. Barreto, H.S. dos Santos, Chemical composition and potentiating

- action of Norfloxacin mediated by the essential oil of *Piper caldense* C.D.C. against *Staphylococcus aureus* strains overexpressing efflux pump genes, *Arch. Microbiol.* 203 (2021) 4727–4736. <https://doi.org/10.1007/S00203-021-02393-5/FIGURES/5>.
- [55] N. Elhidar, B. Soulaïmani, A. Goehler, J.A. Bohnert, A. Abbad, L. Hassani, N.E. Mezrioui, Chemical composition, antibacterial activity and effect of *Rhus albida* Schousb essential oil on the inhibition of NorA efflux pump in *Staphylococcus aureus*, *South African J. Bot.* 142 (2021) 19–24. <https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2021.05.025>.
- [56] E.L. Santos, P.R. Freitas, A.C.J. Araújo, R.S. Almeida, S.R. Tintino, C.L.R. Paulo, J. Ribeiro-Filho, A.C.A. Silva, L.E. Silva, W. do Amaral, C. Deschamps, J.P.S. Junior, J.M.B. Filho, G.R. de Sousa, H.D.M. Coutinho, Phytochemical characterization and antibiotic potentiating effects of the essential oil of *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) and beta-caryophyllene, *South African J. Bot.* 143 (2021) 1–6. <https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2021.07.046>.
- [57] S. Di Giacomo, O. Briz, M.J. Monte, L. Sanchez-Vicente, L. Abete, E. Lozano, G. Mazzanti, A. Di Sotto, J.J.G. Marin, Chemosensitization of hepatocellular carcinoma cells to sorafenib by β -caryophyllene oxide-induced inhibition of ABC export pumps, *Arch. Toxicol.* 93 (2019) 623–634. <https://doi.org/10.1007/S00204-019-02395-9/METRICS>.
- [58] J.M.A. Blair, L.J.V. Piddock, How to measure export via bacterial multidrug resistance efflux pumps, *MBio.* (2016). <https://doi.org/10.1128/mBio.00840-16>.
- [59] S. Gibbons, M. Oluwatuyi, G.W. Kaatz, A novel inhibitor of multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*, *J. Antimicrob. Chemother.* (2003). <https://doi.org/10.1093/jac/dkg044>.
- [60] P.N. Markham, E. Westhaus, K. Klyachko, M.E. Johnson, A.A. Neyfakh, Multiple novel inhibitors of the NorA multidrug transporter of *Staphylococcus aureus*, *Antimicrob. Agents Chemother.* (1999). <https://doi.org/10.1128/aac.43.10.2404>.
- [61] Andrade, J. C.; Coutinho, H.D.M. "In vitro" evaluation of the Modulating Potential of Fat-Soluble Vitamins. 1st ed. New Academic Editions, 2016. 145p.

7 DISCUSSÃO GERAL

Metabólitos secundários são compostos químicos produzidos por plantas como mecanismos de defesa contra patógenos como fungos e bactérias, bem como animais herbívoros. Eles podem ser úteis no tratamento de doenças e infecções, exibindo várias bioatividades comprovadas, como ações antioxidantes, antidiabéticas, antiproliferativas, anti-inflamatórias e antimicrobianas (Prakash; Kumar; Singh; Songachan, 2020).

De acordo com Alsheikh *et al.* (2020), os fitoquímicos podem exercer ação antimicrobiana por meio de mecanismos distintos dos antibióticos convencionais, como inibir a síntese da parede celular e interferir na fisiologia bacteriana pela redução do potencial de membrana e da síntese de ATP. Além disso, eles podem modular a suscetibilidade bacteriana aos antibióticos.

Os componentes dos óleos essenciais podem atuar nas bombas de efluxo, restaurando a eficácia de alguns antibióticos que são alvos de mecanismos de resistência. Os sesquiterpenos apresentam ampla atividade antibacteriana relacionada às suas características lipofílicas (Kon; Rai, 2012).

Oliveira *et al.* (2022) enfatizam que os sesquiterpenos nerolidol, farnesol e α -bisabolol têm o potencial de aumentar a atividade de antimicrobianos convencionais, como gentamicina, oxacilina e metecilina. O farnesol pode potencializar o efeito de antimicrobianos convencionais contra cepas de *S. aureus* RN4220 que produzem o mecanismo de efluxo MsrA. No estudo, os pesquisadores associaram o sesquiterpeno ao ácido fusídico, demonstrando a potencialização desse efeito na CIM.

De acordo com Cruz *et al.* (2020), o α -bisabolol apresentou atividade potencializadora contra antimicrobianos na presença de cepas de *S. aureus* expressando os sistemas de efluxo Tet(K) e NorA. Em seus estudos, Moura *et al.* (2021) demonstraram que o nerolidol é um sesquiterpeno eficaz no tratamento de infecções causadas por bactérias multirresistentes.

Além dos efeitos antimicrobianos dos sesquiterpenos em cepas multirresistentes, estudos revelam que nanoformulações lipossomais podem aumentar a ação terapêutica de antimicrobianos. O encapsulamento do farnesol em lipossomas resultou em atividade antifúngica significativamente aumentada contra cepas de *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, levando a uma redução considerável no IC₅₀ (Barros *et al.*, 2013).

Vários estudos *in vivo* e *in vitro* confirmam a eficácia do encapsulamento de compostos em lipossomas, aumentando a ação antibacteriana e anticancerígena desses compostos (Dutta *et al.*, 2019; Shu *et al.*, 2022). Esses resultados são consistentes com os

dados apresentados para o farnesol em lipossomas contra as cepas 1199B e RN4220, onde houve uma redução no MIC do EtBr.

O trans-cariofileno e o óxido de cariofileno, quando usados individualmente, podem atuar como potenciais inibidores de NorA, Tet(K) e MsrA. O óxido de cariofileno encapsulado também pode atuar na inibição de NorA. A insignificância dos outros resultados do lipossomo com sesquiterpenos pode ser devido à diferença entre a composição lipídica do lipossomo e a membrana bacteriana, o que pode interferir no resultado. Os principais fosfolipídios da membrana de *S. aureus* são fosfatidilglicerol, lisil-fosfatidilglicerol, cardiolipina e glicofosfolipídios (Kuhn; Slavetinsky; Peschel; 2015).

Um estudo conduzido com o óleo essencial de *Piper caldense*, contendo óxido de cariofileno como constituinte principal, e trans-cariofileno, relatou a ação inibitória nas bombas de efluxo NorA, MepA e QacC pelo óleo essencial. Sugerindo que esses sesquiterpenos podem ter influenciado a ação inibitória do óleo essencial (Leal *et al.*, 2021).

O óleo essencial de *Rhus albida* apresentou os principais constituintes: óxido de cariofileno e cariofileno. Neste estudo, Elhidar *et al.* (2021) demonstraram uma ação sinérgica do óleo essencial com ciprofloxacino contra cepas de *S. aureus* 1199 e 1199B portadoras de NorA. Também causou um aumento no acúmulo intracelular de EtBr causado por *R. albida*, indicando inibição da bomba de efluxo NorA.

O óleo essencial de *Aloysia gratissima* contendo óxido de cariofileno e beta-cariofileno potencializou a ação antibacteriana da norfloxacina contra *S. aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Além disso, o isômero beta-cariofileno reduziu o MIC da norfloxacina, ciprofloxacina e EtBr contra as cepas 1199B e K2068. Essas descobertas apoiam os resultados do presente estudo (Santos *et al.*, 2021).

O óxido de β -cariofileno inibiu a atividade de MDR1 e MRP1/2 (bombas de exportação ABC) em células de Alexander de hepatoma humano. Esses resultados indicam que sesquiterpenos como o óxido de cariofileno são alvos promissores para estudos futuros no combate à resistência à quimioterapia em células eucarióticas (Di Giacomo *et al.*, 2019).

O aumento da fluorescência indica inibição da bomba de efluxo MepA. O EtBr é um agente intercalador de DNA que emite fluorescência quando intercalado no genoma bacteriano. Portanto, quanto mais a bomba de efluxo é inibida, maior o aumento da concentração intracelular de EtBr e consequente emissão de fluorescência de EtBr. O efeito inibitório da bomba de efluxo foi apoiado pelo resultado da fluorimetria (Blair *et al.*, 2016).

No presente estudo, pode-se observar que os sesquiterpenos trans-cariofileno e óxido de cariofileno quando nanoencapsulados não apresentam resultados sugestivos em relação ao

efeito terapêutico de redução da CIM, muitas vezes aumentando a concentração. Isso se deve à composição lipossolúvel dos sesquiterpenos que podem interagir com a parede celular de bactérias gram-positivas, que possui uma espessa camada de peptidoglicano que é hidrossolúvel por natureza. Segundo Andrade e Coutinho (2016), estudos relatam que compostos menos polares são mais eficazes contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, devido à presença de cadeias polissacarídicas, que atuam como barreira aos compostos hidrofóbicos ativos na membrana.

8 CONCLUSÃO

- Isolado, o nerolidol exibiu atividade antibacteriana direta contra as cepas IS-58 e RN4220 de *S. aureus*. O farnesol e o α -bisabolol isolados apresentaram atividade antibacteriana direta contra *S. aureus* 1199B, IS-58 e RN4220.
- A formulação lipossomal dos Sesquiterpenos não apresentou eficácia direta contra cepas de *S. aureus*. Em termos de inibição da bomba de efluxo, estes compostos demonstraram eficácia.
- O lipossoma/farnesol e o lipossoma/ α -bisabolol atuaram como potenciais inibidores da NorA presente em *S. aureus* 1199B. Lipossoma/nerolidol e lipossoma/farnesol atuaram como potenciais inibidores de MsrA na cepa de *S. aureus* RN4220.
- Os sesquiterpenos isolados apresentaram ação significativa em sua forma isolada, o nerolidol e o farnesol atuaram como supostos inibidores de NorA e MepA; O α -bisabolol atuou como um suposto inibidor de Tet(K), e o farnesol isolado atuou como inibidor de MsrA e MepA.
- Dentre todas as substâncias testadas, o nerolidol isolado destacou-se pela potente inibição da NorA, sendo ainda mais eficaz que o CCCP.
- O trans-cariofileno e o óxido de cariofileno possivelmente atuam como inibidores das bombas de efluxo NorA, Tet(K), MsrA e MepA em cepas resistentes de *S. aureus*. Mais estudos são necessários para descrever os alvos moleculares envolvidos na ação destes compostos orgânicos.

REFERÊNCIAS

- Aharoni, A; Jongsma, MA; Kim, TY; Ri, MB; Giri, AP; Verstappen, FWA; Schwab, W; and Bouwmeester, HJ; (2006). Metabolic engineering of terpenoid biosynthesis in plants. *Phytochemistry Reviews*, 5:49–58. Doi. <https://doi.org/10.1007/s11101-005-3747-3>
- Ahmad-Mansour, N.; Loubet, P.; Pouget, C.; Dunyach-Remy, C.; Sotto, A.; Lavigne, J.P.; Molle, V. *Staphylococcus aureus* Toxins: An Update on Their Pathogenic Properties and Potential Treatments. *Toxins*, 2021, 13(10):677. <https://doi.org/10.3390/toxins13100677>
- Al Alsheikh, H.M.; Sultan, I.; Kumar, V.; Rather, I.A.; Al-sheikh, H.; Jan, A.T.; Haq, Q.M.R. Plant-Based Phytochemicals as Possible Alternative to Antibiotics in Combating Bacterial Drug Resistance. *Antibiotics*, 2020, 9, 480. [CrossRef]
- Alarif, W.M.; Abdel-Lateff, A.; Alorfi, H.S.; Alburae, N.A. Alcyonacea: uma fonte potencial para a produção de metabólitos que contêm nitrogênio. *Molecules*, 2019, 24 (2): 286. <https://doi.org/10.3390/molecules24020286>.
- Alavi, SE; Koohi Moftakhari Esfahani, M.; Raza, A.; Adelnia, H.; Ebrahimi Shahmabadi, H. Lipossomas enxertados com PEG para atividades antibacterianas e antibióticas aprimoradas: um estudo in vivo. *NanoImpact*, 2022 , 25 , 100384.
- Albuquerque, Maria Carolina de. Efeito in vivo de inibidores do sistema de efluxo na virulência de *Candida albicans* resstente a fluconazol. Trabalho de oonctusao de curso (Bacharelado- Odontologia) – Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia. Araraquara, 2022, 31 p.
- Almeida, G.D.; Godoi, E.P.; Santos, E.C.; Lima, L.R.P.; Oliveira, M.E. Extrato aquoso de *Allium sativum* potencializa a ação dos antibióticos vancomicina, gentamicina e tetraciclina frente *Staphylococcus aureus*. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 2013, 34(4): 487-492.
- Alonso, L.; Fernandes, K.S.; Mendanha, S.A.; Gonçalves, P.J.; Gomes, R.S.; Dorta, M.L.; Alonso, A. In vitro antileishmanial and cytotoxic activities of nerolidol are associated with changes in plasma membrane dynamics. *Biochimica et Biophysica, Acta-Biomembranas*, 2019, 1861(6):1049-1056. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.03.006>.
- Alonzo, F; Torres, V.J. As leucocidinas formadoras de poros bicomponentes de *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2014,78(2):199–230.
- Azzi, J.; Auezova, L.; Danjou, P.E.; Fourmentin, S.; Greige-Gerges, H. First evaluation of drug-in-cyclodextrin-in-liposomes as an encapsulating system for nerolidol. *Food Chemistry*, 2018, 255:399-404.
- Andrade, J.C.; Coutinho, H.D.M. "In vitro" evaluation of the Modulating Potential of Fat-Soluble Vitamins. 1st ed. *New Academic Editions*, 2016, 145p.
- Baldissera, Matheus Dellaméa. **Nanotecnologia potencializa a ação tripanocida do nerolidol em camundongos infectados com *Trypanosoma evansi*: envolvimento da**

barreira hematoencefálica. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, 2018, 57 p.

Barros, N.B.; Migliaccio, V.; Facundo, V.A.; Ciancaglini, P; Stábeli, RG; Nicolete, R; Silva-Jardim, I. Liposomal-lupane system as alternative chemotherapy against cutaneous leishmaniasis: Macrophage as target cell, *Experimental Parasitology*, 135: 337–343. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.07.022>.

Batista, C. M., Carvalho, C. M. B. de ., & Magalhães, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 2007, 43(2), 167–179. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322007000200003>

Bay, D.C.; Turner, R. J. Diversity and evolution of the small multidrug resistance protein family. *BMC Evolutionary Biology*, 2009, 9(1):1-27.

Berube, B.J.; Bubeck, W.J.; *Staphylococcus aureus* alfa-toxina: quase um século de intriga. *Toxinas*, 2013, 5(6):1140–1166.

Bezerra, S.B. Atividade gastroprotetora e antimicrobiana do extrato seco de *Matricaria recutita* (camomila) e do alfa-bisabolol: possíveis mecanismos de ação [dissertação.] Fortaleza (CE). Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará; 2009.

Bezerra, C.F, Almeida Júnior, J.G.; Honorato, R.L.; Santos, A.T.L.; Silva, J.C.P.; Silva, T.G.; Freitas, T.S.; Vieira, T.A.T.; Bezerra, M.C.F; Sales D.L; Rodrigues, J.P.V. Barbosa Filho, J.M.; Peixoto, L.R.; Pinheiro, A.P.; Coutinho, H.D.M. Braga, M.F.B.M.; Silva, T.G. Antifungal Effect of Liposomal α -Bisabolol and When Associated with Fluconazole. *Cosmetics*. 2021; 8(2):28. <https://doi.org/10.3390/cosmetics8020028>

Blair, J.M.A.; Piddock, L.J.V. How to measure export via bacterial multidrug resistance efflux pumps, MBio. (2016). <https://doi.org/10.1128/mBio.00840-16>.

Bouillier, K.; Bertrand, X.; Hocquet, D. *et al.* Human Infection of Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* CC398: a Review. *Microorganisms*, 2020, 8:11.

Camilo, CJ; Leite, DOD.; Silva, ARA.; Menezes, IRA.; Coutinho, HDM.; and Costa, JGM.; (2020). Vesículas lipídicas: aplicações, componentes principais e métodos usados nas suas formulações: uma revisão. *Acta Biológica Colombiana*, 25(2):339-352. <https://dx.doi.org/10.15446/abc.v25n2.74830>

Castelo-Branco DSCM, Riello GB, et al., Farnesol increases the susceptibility of *Burkholderia pseudomallei* biofilm to antimicrobials used to treat melioidosis, *Journal Appl Microbiology*, 2016, 120(3), 600–606.

Caster, JM; Yu, SK; Patel, AN; Newman, NJ; Lee, ZJ; Warner, SB; Wagner, KT; Roche, KC; Tian, X.; Min, Y.; et al. Efeito do tamanho de partícula na biodistribuição, toxicidade e eficácia de nanopartículas poliméricas carregadas com fármacos na quimiorradioterapia. *Nanomed. Nanotecnologia. Biol. Med.* 2017, 13, 1673–1683.

Chorilli, M.; leonardi, GR; Oliveira, AG; Scarpa, MV; (2004). Lipossomas em formulações dermocosméticas. **Infarma**. 16:75-79. Disponível em: <http://www.nanobiotec.iqm.unicamp.br/download/lipossomasecosmeticos.pdf>. Acesso: 12 de

COSTA, R. H. S. *et al.* Evaluation of antibacterial activity and reversal of the NorA and MepA efflux pump of estragole against *Staphylococcus aureus* bacteria. **Archives of Microbiology**, 2021, 203(6):3551–3555.

Cruz, R.P.; de Freitas, T.S.; Costa, M.D.S.; Dos Santos, A.T.L.; Campina, F.F.; Pereira, R.L.S.; Bezerra, J.W.A.; Quintans-Júnior, L.J.; Araújo, A.A.D.S.; De Siqueira Júnior, J.P.; et al. Effect of α -Bisabolol and Its-Cyclodextrin Complex as TetK and NorA Efflux Pump Inhibitors in *Staphylococcus aureus* Strains. **Antibiotics**, 2020, 9, 28.

Danaei, M.; Dehghankhold, M.; Ataei, S.; Hasanzadeh Davarani, F.; Javanmard, R.; Dokhani, A.; Khorasani, S.; Mozafari, MR Impacto do tamanho de partícula e índice de polidispersão nas aplicações clínicas de sistemas de nanocarreadores lipídicos. **Farmacêutica** 2018, 10 , 57.

Moura, D.F., Rocha, T.A.; Barros, D.M. *et al.* Avaliação da atividade antioxidante, antibacteriana e antibiofilme do sesquiterpeno nerolidol. **Arch Microbiol** 203, 2021, 4303–4311. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02377-5>

Souza, E. R. L., Gomes, N. M. L., de Araújo Cruz, J. H., dos Santos, J. F. D., & de Oliveira Filho, A. A. Propriedades farmacológicas do Sesquiterpeno α -Bisabolol: uma breve revisão. **Archives of Health Investigation**, 2021, 10(1), 18-23. doi:<https://doi.org/10.21270/archi.v10i1.3183>

Delmondes, G.A.; Lemos, I.C.S.; Dias, D.Q.; Cunha, G.L.; Araújo, I.M.; Barbosa, R.; Coutinho, H.D.M.; Felipe, C.F.B.; Barbosa-Filho, J.M.; Lima, N.T.R.; Menezes; I.R.A.; Kerntopf, M.R. Pharmacological applications of farnesol (C₁₅H₂₆O): a patent review, **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, 2020, (30)3:227-234, doi: <https://doi.org/10.1080/13543776.2020.1718653>

Diaz, M.A.N.; Rossi, C.C.; Mendonça, V.R.; Silva, D.M.; Ribon, A.O.B.; Aguilar, A.P.; Muñoz, G.D. Screening of medicinal plants for antibacterial activities on *Staphylococcus aureus* trains isolated from bovine mastitis. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 2010, 20(5):724-728. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2010005000013>.

Diniz, E. F. C *et al.* Prospecção Tecnológica: Estudos Sobre Complexo de Inclusão do Nerolidol com A β -Ciclodextrina. **Cadernos de Prospecção**, 2016, 9(3):307.

S. Di Giacomo, O. Briz, M.J. Monte, L. Sanchez-Vicente, L. Abete, E. Lozano, G. Mazzanti, A. Di Sotto, J.J.G. Marin, Chemosensitization of hepatocellular carcinoma cells to sorafenib by β -caryophyllene oxide-induced inhibition of ABC export pumps, **Arch. Toxicol.**, 2019, 93:623–634. doi. <https://doi.org/10.1007/S00204-019-02395-9/METRICS>

Drew, D.; North, R.A.; Nagarathinam, K.; Tanabe, M. Structures and General Transport Mechanisms by the Major Facilitator Superfamily (MFS). **Chemical Reviews**, 2020, 121(9):5289-5335, <http://dx.doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00983>

- Dutta, D.; Paul, B.; Mukherjee, B.; Mondal, L.; Sen, S.; Chowdhury, C.; Debnath, M.C. Nanoencapsulated Betulinic Acid Analogue Distinctively Improves Colorectal Carcinoma In Vitro and In Vivo. **Sci. Rep.** 2019, 9:11506.
- Elbourne, L.D.; Tetu, S.G.; Hassan, K.A.; Paulsen, I.T. TransportDB 2.0: a database for exploring membrane transporters in sequenced genomes from all domains of life. **Nucleic Acids Res.** 2017, 45(1):320-D324. doi: 10.1093/nar/gkw1068.
- Elhidar, N.; Soulaïmani, B.; Goehler, A.; Bohnert, J.A.; Abbad, A.; Hassani, L.; Mezrioui, N.E. Chemical composition, antibacterial activity and effect of *Rhus albida* Schousb essential oil on the inhibition of NorA efflux pump in *Staphylococcus aureus*, **South African J. Bot.**, 2021, 142:19–24. <https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2021.05.025>
- Espinoza, J.; Urzúa, A.; Sanhueza, L.; Walter, M.; Fincheira, P.; Muñoz, P.; Mendoza, L.; Wilkens, M. Óleo essencial, extratos e sesquiterpenos obtidos do cerne de *Pilgerodendron uviferum* agem como inibidores potenciais de Bomba de efluxo multidroga do *Staphylococcus aureus* NorA. **Microbiology.** 2019. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00337>
- Fisher EL, Otto M, Cheung GYC. Basis of Virulence in Enterotoxin-Mediated Staphylococcal Food Poisoning. **Front Microbiol.** 2018, 9:436.
- Fraga, BM; (2013). Natural sesquiterpenoids. Natural Product Reports, 29 (11): 1334-1366. doi: <https://doi.org/10.1039/c2np20074k>.
- Frieri, M; Kumar, K; Boutin, A.; Antibiotic resistance. **Journal of Infection and Public Health**, 2017, 10(4):369-378, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.08.007>
- German, N.; Kaatz, G. W.; Kerns, R. J. Synthesis and evaluation of PSSRI-based inhibitors of *Staphylococcus aureus* multidrug efflux pumps. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, 18, 1368-1373, 2008.
- Gomes, F.M.S.; Xavier, J.C.; Santos, J.F.S.; Matos, Y.M.L.S.; Tintino, S.R.; Freitas, T.S.; Coutinho, H.D.M. Evaluation of antibacterial and modifying action of catechin antibiotics in resistant strains. **Microbial Pathogenesis**, 2018, 115:175-178. doi: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.12.058>.
- Gonzalez Gomez, A.; Hosseinidoust, Z. Lipossomas para encapsulamento e administração de antibióticos. **ACS Infect. Dis.**, 2020, 6:896–908.
- González-Bello, C. Antibiotic adjuvants – A strategy to unlock bacterial resistance to antibiotics. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 2017, 27(18):4221-4228. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.08.027>.
- González-Vega, J.G; Garcia-Ramos, J.C.; Chávez-Santoscoy, R.A.; Castillo-Quñones, J.E.; Arellano-Garcia, M.E.; Toledano-Magaña, Y. Modelos pulmonares para avaliar a toxicidade das nanopartículas de prata e seu impacto na saúde humana. **Nanomateriais**, 2022, 12, 2316.
- Gordon, Y.C.; Cheung, Justin, S. Bae, M.O. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*, **Virulence**, 2021, 12(1):547-569, DOI: 10.1080/21505594.2021.1878688

Guimarães, AG; Quintans, J.S.; Quintans Junior, L.J. Monoterpenes with analgesic activity: an systematic review. *Phytotherapy Research*, 2013, 27 (1):1-15. doi: <https://doi.org/10.1002/ptr.4686>.

Hassan, K.A., Jackson, S.M.; Penesyan, A.; Patching, S.G.; Tetu, S.G.; Eijkelkamp, B.A. Transcriptomic and biochemical analyses identify a family of chlorhexidine efflux proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013, 110:20254–20259.

Hassan, K.A.; Liu, Q.; Elbourne, L.D.H.; Ahmad, I.; Sharples, D.; Naidu, V.; Chan, C.L.; Li, L.; Harborne, S.P.D.; Pokhrel, A.; Postis, V.L.G.; Goldman, A.; Henderson, P.J.F.; Paulsen, I.T. Pacing across the membrane: the novel PACE family of efflux pumps is widespread in Gram-negative pathogens. *Res Microbiol*. 2018,169(7-8):450-454. doi: 10.1016/j.resmic.2018.01.001.

Hodille, E.; Cuerc, C.; Badiou, C. *et al.* Delta hemolisina e modulinas solúveis em fenol, mas não alfa hemolisina ou leucocidina Pantón-Valentine, induzem a ativação de mastócitos. *Microbiol de infecção de células frontais*, 2016, 6:180.

Homem, I.C.M. Estudos fitoquímicos, ensaios de toxicidade, atividade larvicida, antimicrobiana e antioxidante das folhas e caules de *Mollinedia clavigera* Tul. (Monimiaceae). Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. Curitiba – PR, 2015, 109 p. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/37610/R%20-%20D%20%20ISABEL%20CHRISTINA%20MIGNONI%20HOMEM.pdf?sequence=3&isAllowed=y>. Acesso em: 12 de janeiro de 2021.

Honary, S.; Zahir, F. Efeito do potencial zeta nas propriedades dos sistemas de administração de nanodrogas: uma revisão (parte 2). *Trop. J. Pharm. Res.* 2013, 12:265–273.

Hoseini, B.; Jaafari, MR; Golabpour, A.; Momtazi-Borojeni, A.A; Karimi, M.; Eslami, S. Aplicação da abordagem de aprendizado de máquina de conjunto para avaliar os fatores que afetam o tamanho e o índice de polidispersão de nanopartículas lipossômicas. *Sci. Rep.* 2023, 13:18012.

Hufschmid, R.; Teeman, E.; Mehdi, B.L.; Krishnan, K.M.; Browning, N.D. Observando a estabilidade coloidal de nanopartículas de óxido de ferro *in situ*. *Nanoscale*, 2019, 11, 13098–13107.

Idrees, M, Sawant S, Karodia N, Rahman A. Biofilme de *Staphylococcus aureus*: Morfologia, Genética, Patogênese e Estratégias de Tratamento. *Jornal Internacional de Pesquisa Ambiental e Saúde Pública*. 2021; 18(14):7602. doi. <https://doi.org/10.3390/ijerph18147602>

Juan-Carlos, P.D.M., Perla-Lidia, P.P., Stephanie-Talia, M.M. *et al.* ABC transporter superfamily. An updated overview, relevance in cancer multidrug resistance and perspectives with personalized medicine. *Mol Biol Rep.*, 2021, 48, 1883–1901. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06155-w>

Kaatz, G.W.; Moudgal, V.V.; Seo, S.M.; Kristiansen, J.E. Phenothiazines and Thioxanthenes Inhibit Multidrug Efflux Pump Activity in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003, 47, 719–726.

Kaatz, G.W.; Demarco, C. E.; Seo, S. M. MepR a repressor of the *Staphylococcus aureus* MATE family multidrug efflux pump MepA, is a substrate-responsive regulatory protein. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2006, 50(4):1276-1281.

Kang, M.; Ko, Y.P.; Liang, X. *et al.* Collagen-binding microbial surface components recognizing adhesive matrix molecule (MSCRAMM) of Gram-positive bacteria inhibit complement activation via the classical pathway. *J Biol Chem.*, 2013, 288(28):20520–20531.

Kapoor, K. *Illustrated Dictionary of Microbiology*. NewDelhi: Oxford, 2010.

Klopell, F.C.; Lemos, M., Sousa, J.P.B.; Comunello, E.; Maistro, E.L.; Bastos, J.K.; Andrade, S.F. "Nerolidol, um constituinte antiúlcera do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae)", *Zeitschrift für Naturforschung C*, 2007, 62: 7-8. Doi. <https://doi.org/10.1515/znc-2007-7-812>.

Kon, K.V.; Rai, M.K. Plant Essential Oils and Their Constituents in Coping with Multidrug-Resistant Bacteria. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* 2012, 10: 775–790.

Kourtis, A.P.; Hatfield, K.; Baggs, J. Ham D, Capers, C.; Ewing, H.; Coffin, N.; McDonald, L.C.; Jernigan, J.; Cardo, D. Vital Signs: Epidemiology and Recent Trends in Methicillin-Resistant and in Methicillin-Susceptible *Staphylococcus Aureus* Bloodstream Infections. *Emerging Infections Program Mag.*, 2019, 68(9):214–219.

Krasowska, A.; Sigler, K. Como os microrganismos usam a hidrofobicidade e o que isso significa para as necessidades humanas? *Frente. Célula. Infectar. Microbiol.*, 2014, 4.

Kuroda, T.; Tsuchiya, T. Multidrug efflux transporters in the MATE family, *Biochimica et Biophysica Acta: Proteins and Proteomics*, 2009, 1794(5):763-768.

Kusakizako, T.; Miyauchi, H.; Ishitani, R, Nureki, O. Structural biology of the multidrug and toxic compound extrusion superfamily transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA): Biomembranes*, 2020, 1862(12): 83154. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.183154>

Kuhn, S.; Slavetinsky, C.J.; Peschel, A.; Synthesis and function of phospholipids in *Staphylococcus aureus*, *Int. J. Med. Microbiol.*, 2015, 305:196–202. <https://doi.org/10.1016/J.IJMM.2014.12.016>.

Leal, A.L.A.B.; Bezerra, C.F.; Confortin, C.; Silva, L.E.; Marinho, E.M.; Marinho, M.M.; Vasconcelos, M.A.; Silva, T.G.; Marinho, E.S.; Teixeira, E.M.R.; Coutinho, H.D.M.; Barreto, H.M.; Santos, H.S. Chemical composition and potentiating action of Norfloxacin mediated by the essential oil of *Piper caldense* C.D.C. against *Staphylococcus aureus* strains overexpressing efflux pump genes, *Arch. Microbiol.*, 2021, 203: 4727–4736. <https://doi.org/10.1007/S00203-021-02393-5/FIGURES/5>

Lekshmi, M. *et al.* Modulation of antimicrobial efflux pumps of the major facilitator superfamily in *Staphylococcus aureus*. *AIMS Microbiology*, 2018, 4(1): 1–18.

Li, X. Z.; Nikaido, H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs*, 64, 159-204, 2004.

Li, C.; Li, X.; Li, S.; Weng, Y.; Wang, K.; Zhang, T.; Chen, S.; Lu, X.; Jiang, Y.; Liang, J. Desenvolvimento e validação de um método para determinação da eficiência de encapsulamento de nanopartículas CPT-11/DSPE-MPEG2000. **Med. Chem.**, 2016, 6: 345–348.

Liu, H, Archer NK, Dillen CA, et al. A exposição epicutânea de *Staphylococcus aureus* causa inflamação da pele por meio de respostas de células T mediadas por IL-36. **Micróbio hospedeiro celular**. 2017, 22(5):653–665.

Luo, Q.; Lu, P.; Chen, Y.; Shen, P.; Zheng, B.; Ji, J.; Ying, C.; Liu, Z.; Xiao, Y. ESKAPE in China: epidemiology and characteristics of antibiotic resistance. **Emerg Microbes Infect.**, 2024, 13(1):2317915. doi: 10.1080/22221751.2024.2317915

Maikranz, E.; Spengler, C.; Thewes, N.; Thewes, A.; Nolle, F.; Jung, P.; Bischoff, M.; Santen, L.; Jacobs, K. Diferentes mecanismos de ligação de: *Staphylococcus aureus* a superfícies hidrofóbicas e hidrofílicas. **Nanoescala**, 2020, 12, 19267–19275.

Martin, Ana Luiza de Aguiar Rocha. Efeito *in vitro* e *in silico* de derivados cumarínicos na inibição da função da bomba de efluxo MepA e NorA em *Staphylococcus aureus* / Ana Luiza de Aguiar Rocha Martin. – 2023. 101 f. : il. color. Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2023.

Maurya, AK; Singh, M; Dubey, V; Srivastava, S; Luqman, S; (2014). α -(-)-bisabolol reduces pro-inflammatory cytokine production and ameliorates skin inflammation. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, 2014, 15:173–181. doi: <https://doi.org/10.2174/1389201015666140528152946>

Melo, J.I.M. *et al.* Boraginaceae. In: Forzza, R.C. *et al.* (Org.). Lista de espécies da flora do Brasil. Rio de Janeiro: **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2012.

Minelli, R.; Serpe, L.; Pettazzoni, P.; Minero, V.; Barrera, G.; Gigliotti, CL; Mesturini, R.; Rosa, AC; Gasco, P.; Vivenza, N.; et al. Nanopartículas lipídicas sólidas de butirato de colesterol inibem a adesão e a migração de células de câncer de cólon. **Brazilian Journal. Pharmacol.**, 2012, 166: 587–601.

Moazeni, M.; Kelidari, HR; Saeedi, M.; Morteza-Semnani, K.; Nabili, M.; Gohar, AA; Akbari, J.; Lotfali, E.; Nokhodchi, A. Hora de superar isolados de *Candida* resistentes ao fluconazol: nanopartículas lipídicas sólidas como um novo sistema de administração de medicamentos antifúngicos. **Colloids Surf. B Biointerfaces** **2016** , 142 , 400–407.

Morales-Perez, Mayasil; Garcia-Milian, Ana Julia. Papel de la superfamilia ABC en la resistencia farmacológica. **Horiz. sanitario**, 2017 , 16(2): 93-101. Disponible en <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-74592017000200093&lng=es&nrm=iso>. accedido en 21 mayo 2024. <https://doi.org/10.19136/hs.v16i2.1469>

Moreira, MAS.; Ferreira, AB; Trindade, TFSL; Reis, ALO.; Moraes, CA; (2008) Resistência a antimicrobianos dependente do sistema de efluxo multidrogas em *Escherichia coli* isoladas

de leite mastítico. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 60(6):1307-1314. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352008000600003>.

Moura, D. F. De; Martins, R. D.; Silva, M. V.. Nerolidol: Fitoconstituinte de Óleos Essenciais de Plantas da Caatinga/ Nerolidol: Phytoconstituent of Essential Oils of Caatinga Plants. *Brazilian Journal of Development*, 2020, 5(12):33402–33416. doi10.34117/bjdv5n12-384. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/5813>. Acesso em: 15 nov. 2023.

Moura, D.F.; Rocha, T.A.; de Melo Barros, D.; da Silva, M.M.; dos Santos Santana, M.; Neta, B.M.; Cavalcanti, I.M.F.; Martins, R.D.; da Silva, M.V. Evaluation of the Antioxidant, Antibacterial, and Antibiofilm Activity of the Sesquiterpene Nerolidol. *Arch. Microbiol.* 2021, 203: 4303–4311.

Mühlen, S; Dersch, P. Anti-virulence Strategies to Target Bacterial Infections. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2016, 398:147-183. doi: https://doi.org/10.1007/82_2015_490

Myers, A.G. *et al.* Synthesis of tetracyclines and analogues thereof. **US7807842B2**, 2010.

Nelson, M. L.; Alekshun, M. N. Substituted polyamines as inhibitors of bacterial efflux pumps. **WO2004062674A2**, 2004.

Nair, M. *et al.* Getting into the brain: Potential of nanotechnology in the management of NeuroAIDS. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2016, 103: 202-217.

Nikaido, H. RND transporters in the living world. *Research in Microbiology*, 2018, 169(7–8):363-371. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2018.03.001>

Nikaido, H. Structure and mechanism of RND-type multidrug efflux pumps. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 2010, 77: 1.

Oethinger, M.; Levy, S. B. Methods of screening for compounds that reduce microbial resistance to fluoroquinolones. **US8012711B2**, 2011.

Oliveira, R.A.G.; Lima, E.O.; Vieira, W.L.; Freire, K.R.L.; Trajano, V.N.; Lima, I.O.; Souza, E.L.; Toledo, M.S.; Silva Filho, R.N. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2006, 16(1):77-82. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2006000100014>

Oliveira-Tintino, C.D.M.; Santana, J.E.G.; Alencar, G.G.; Siqueira, G.M.; Gonçalves, S.A.; Tintino, S.R.; Menezes, I.R.A.d.; Rodrigues, J.P.V.; Gonçalves, V.B.P.; Nicolette, R.; et al. Valencene, Nootkatone and Their Liposomal Nanoformulations as Potential Inhibitors of NorA, Tet(K), MsrA, and MepA Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus* Strains. *Pharmaceutics*, 2023, 15, 2400. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15102400>

Oliveira, D.; Borges, A.; Saavedra, M.J.; Borges, F.; Simões, M. Screening of Natural Molecules as Adjuvants to Topical Antibiotics to Treat *Staphylococcus aureus* from Diabetic Foot Ulcer Infections. *Antibiotics*, 2022, 11: 620.

Ono, H.K.; Hirose, S.; Narita, K.; *et al.* Histamine release from intestinal mast cells induced by *staphylococcal enterotoxin A* (SEA) evokes vomiting reflex in common marmoset. ***PLoS Pathog.***, 2019, 15(5):e1007803.

Petrova, OE; Sauer, K. Situações pegajosas: Componentes principais que controlam a fixação da superfície bacteriana. ***J. Bacteriol.*** 2012, 194: 2413–2425.

Piddock, L.J.V. Multidrug-resistance efflux pumps-not just resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 2006, 4: 629-636. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1464>

Pinto, C.P.; Rodrigues, V.D.; Pinto, F.P.; Pinto, R.P.; Uetanabaro, A.P.T.; Pinheiro, C.S.R.; Gadea, S.F.M.; Silva, TRS; Lucchese, A.M. Antimicrobial activity of *Lippia* species from the Brazilian semiarid region traditionally used as antiseptic and anti-infective agents. ***Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine***, 2013: 1-5. doi: <https://doi.org/10.1155/2013/614501>

Prakash, B.; Kumar, A.; Singh, P.P.; Songachan, L.S. Antimicrobial and Antioxidant Properties of Phytochemicals. ***Funct. Preserv. Prop. Phytochem.*** 2020, 1:1–45.

Probst, I.S.. Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico, Botucatu – SP. Dissertação (mestrado), Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 112 p. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/87926?show=full>. Acesso em: 12 de janeiro de 2021.

Putman, M.; Van Veen, H. W.; Konings, W. N. Molecular Properties of Bacterial Multidrug Transporters. ***Microbiology and Molecular Biology Reviews***, v. 64, n. 4, p. 672-693, 2000.

Ramalhete, C.; Spengler, G.; Martins, A.; Martins, M.; Viveiros, M.; Mulhovo, S.; Ferreira, M.J.U.; Amaral, L. Inhibition of Efflux Pumps in Meticillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* Resistant Strains by Triterpenoids from *Momordica balsamina*. ***Int. J. Antimicrob. Agents***, 2011, 37:70–74.

Rezende-Júnior, L. M. et al. Chalcones Isolated from *Arrabidaea brachypoda* Flowers as Inhibitors of NorA and MepA Multidrug Efflux Pumps of *Staphylococcus aureus*. ***Antibiotics***, 2020, 9(6): 351.

Rocha, N.F.; Rios, E.R.; Carvalho, A.M.; Cerqueira, G.S.; Lopes, A.A.; Leal, L.K.; Dias, M.L.; de Sousa, D.P.; de Sousa, F.C. Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of (-)- α -bisabolol in rodents. ***Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology***, 2011, 384(6):525-33. doi: <https://doi.org/10.1007/s00210-011-0679-x>

Rocha, J. E. *et al.* Antibacterial and antibiotic modifying activity, ADMET study and molecular docking of synthetic chalcone (E)-1-(2-hydroxyphenyl)-3-(2,4-dimethoxy-3-methylphenyl)prop-2-en-1-one in strains of *Staphylococcus aureus* carrying NorA and MepA efflux pumps. ***Biomedicine and Pharmacotherapy***, 2021, 140:111768.

Rodríguez, J.; Martín, M.J.; Ruiz, M.A.; Clares, B. Current encapsulation strategies for bioactive oils: From alimentary to pharmaceutical perspectives, **Food Research International**, 2016, 83: 41-59. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.032>

Rossi-Bergmann, B. A nanotecnologia: da saúde para além do determinismo tecnológico. **Ciência e Cultura**, 2008, 60(2):54-57.
http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252008000200024&lng=en&tlng=pt.

Senn, L.; Clerc, O.; Zanetti, G. *et al.* The Stealthy Superbug: the Role of Asymptomatic Enteric Carriage in Maintaining a Long-Term Hospital Outbreak of ST228 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **mBio.**, 2016, 7(1):e02039–15.

Shu, G.; Xu, D.; Zhang, W.; Zhao, X.; Li, H.; Xu, F.; Yin, L.; Peng, X.; Fu, H.; Chang, L.J.; *et al.* Preparation of Shikonin Liposome and Evaluation of Its In Vitro Antibacterial and In Vivo Infected Wound Healing Activity. **Phytomedicine**, 2022, 99: 154035.

Silva, Leidiane Pinho da. Ação antiespasmódica do trans-cariofileno e o bloqueio de canais para Ca²⁺ em músculo liso traqueal de rato. 2010. 95 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico ou Profissional em 2010) - Universidade Estadual do Ceará, , 2010. Disponível em: <<http://siduece.uece.br/siduece/trabalhoAcademicoPublico.jsf?id=59877>> Acesso em: 15 de novembro de 2023

Smith, M.C.; Crist, R.M.; Clogston, J.D.; McNeil, S.E. Potencial Zeta: Um Estudo de Caso de Lipossomas Catiônicos, Aniônicos e Neutros. **Anal. Bioanal. Chem.**, 2017, 409: 5779–5787.

Sun, J.; Deng, Z.; Yan, A. Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2014, 453(2): 254-267.

Thurlow, L.R.; Hanke, M.L.; Fritz, T. *et al.* Os biofilmes de *Staphylococcus aureus* previnem a fagocitose de macrófagos e atenuam a inflamação in vivo. **Jornal de Imunologia**, 2011, 186(11):6585–6596.

Tran, S.; Di Giovanni, P.J.; Piel, B.; Rai, P. Cancer nanomedicine: a review of recent success in drug delivery. **Clinical and Translational Medicine**, 2017, 6(1):44. doi: <https://doi.org/10.1186/s40169-017-0175-0>.

Trindade, J.K.M.; Trindade, Í.T.M.; Abegg, M.A.; Corrêa, G.M.; Carmo, D.F.M. Chemical profile and antimicrobial activity of essential oil from *Psidium guajava* L. (Myrtaceae) varieties. **Research, Society and Development**, 2021, 10(10): e211101018794. doi. 10.33448/rsd-v10i10.18794. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/18794> Acesso em: 15 nov. 2023.

Tucker, A.T.; Nowicki, E.M.; Boll, J.M.; Knauf, G.A.; Burdis, N.C.; Trent, M.S.; Davies, B.W. Defining gene-phenotype relationships in *Acinetobacter baumannii* through one-step chromosomal gene inactivation. **mBio.**, 2014, 5(4):e01313-14. doi: 10.1128/mBio.01313-14. .

Turner, N.A.; Sharma-Kuinkel, B.K.; Maskarinec, S.A. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. **Nat. Rev. Microbiol.**, 2019, 17(4):203–218.

Vasas, A.; Hohmann, J. Xanthane sesquiterpenoids: structure, synthesis and biological activity. **Natural Product Reports**, 2011, 28: 824–842. doi: <https://doi.org/10.1039/c0np00011f>.

Webb, M.S.; Boman, N.L.; Wiseman, D.J.; Saxon, D.; Sutton, K.; Logan, P.; Hope, M.J. Eficácia antibacteriana contra um modelo de infecção in vivo por *Salmonella typhimurium* e farmacocinética de uma formulação lipossomal de ciprofloxacino. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 1998, 42, 45–52.

Westbrock-Wadman, S.; Sherman, D.R.; Hickey, M.J.; Coulter, S.N.; Zhu, Y.Q.; Warrenner, P.; Nguyen, L.Y.; Shawar, R.M.; Folger, K.R.; Stover, C.K. Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* efflux pump contributing to the impermeability of aminoglycosides. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 1999, 43 (12): 2975–2983. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.12.2975>

WHO - World Health Organization. Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance, 2014. <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/> 2014.

Wilfinger, W.W.; Mackey, K.; Chomczynski, P. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. **BioTechniques**, 1997, 22: 474. <https://doi.org/10.2144/97223st01>

Wilhelm, S.; Tavares, A.J.; Dai, Q.; Ohta, S.; Dvorak, HF; Chan, WCW Análise da administração de nanopartículas em tumores. **Nat. Rev. Mater.**, 2016 , 1: 16014.

Yoshihara, E.; Inoko, H. Method or agent for inhibiting the function of efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa*. **US7985410B2**, 2011.

Zgurskaya, H. I. et al. Structural and functional diversity of bacterial membrane fusion proteins. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, 2009, 1794(5): 794–807.

Zhang Y, Wu M, Hang T, et al. *Staphylococcus aureus* SdrE captures complement factor H's C-terminus via a novel 'close, dock, lock and latch mechanism for complement evasion. **Biochem. Journal**, 2017;474(10):1619–1631.

Zhou, J. et al. Resistance to drug by different isolates *Trypanosoma evansi* in China. **Acta Tropica**, 2004. 90: 271–275.