

ABORDAGENS METODOLÓGICAS PARA A AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DE BOMBAS DE EFLUXO BACTERIANA, UMA REVISÃO NARRATIVA

METHODOLOGICAL APPROACHES FOR THE EVALUATION OF BACTERIAL EFFLUX PUMP INHIBITION, A NARRATIVE REVIEW

ENFOQUES METODOLÓGICOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE BOMBAS DE EFLUJO BACTERIANAS, UNA REVISIÓN NARRATIVA

Lucas dos Santos Sa¹

RESUMO: A resistência antimicrobiana representa um dos maiores desafios da saúde pública global, sendo frequentemente associada à expressão e à hiperatividade de bombas de efluxo bacterianas, que reduzem a concentração intracelular de antibióticos e outros agentes terapêuticos. A identificação de compostos capazes de inibir esses sistemas de efluxo tem emergido como uma estratégia promissora para restaurar a eficácia de antibióticos convencionais. Nesse contexto, metodologias robustas e bem estabelecidas para a análise da inibição de bombas de efluxo são essenciais para a validação de novos moduladores. Esta revisão narrativa tem como objetivo discutir criticamente as principais metodologias empregadas na análise da inibição de bombas de efluxo bacterianas, abordando ensaios fenotípicos, bioquímicos, fluorimétricos, genéticos e computacionais, bem como suas aplicações, vantagens, limitações e relevância para estudos voltados ao desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos.

1

Palavras-chave: Bombas de efluxo. Resistência antimicrobiana. Inibidores de efluxo. Metodologias experimentais.

ABSTRACT: Antimicrobial resistance represents one of the biggest challenges in global public health, being frequently associated with the expression and hyperactivity of bacterial efflux pumps, which reduce the intracellular concentration of antibiotics and other therapeutic agents. The identification of compounds capable of inhibiting these efflux systems has emerged as a promising strategy to restore the effectiveness of conventional antibiotics. In this context, robust and well-established methodologies for analyzing the inhibition of efflux pumps are essential for the validation of new modulators. This narrative review aims to critically discuss the main methodologies used in the analysis of the inhibition of bacterial efflux pumps, covering phenotypic, biochemical, fluorimetric, genetic and computational assays, as well as their applications, advantages, limitations and relevance for studies aimed at the development of new antimicrobial agents.

Keywords: Efflux pumps. Antimicrobial resistance. Efflux pump inhibitors. Experimental methodologies.

¹ Licenciado em Ciências Biológicas pela Universidade Regional do Cariri-URCA.

RESUMEN: La resistencia antimicrobiana representa uno de los mayores desafíos para la salud pública mundial y se asocia frecuentemente con la expresión y la hiperactividad de las bombas de eflujo bacterianas, que reducen la concentración intracelular de antibióticos y otros agentes terapéuticos. La identificación de compuestos capaces de inhibir estos sistemas de eflujo ha surgido como una estrategia prometedora para restaurar la eficacia de los antibióticos convencionales. En este contexto, metodologías robustas y bien establecidas para el análisis de la inhibición de las bombas de eflujo son esenciales para la validación de nuevos moduladores. Esta revisión narrativa tiene como objetivo discutir críticamente las principales metodologías empleadas en el análisis de la inhibición de bombas de eflujo bacterianas, abordando ensayos fenotípicos, bioquímicos, fluorimétricos, genéticos y computacionales, así como sus aplicaciones, ventajas, limitaciones y relevancia para estudios orientados al desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos.

Palabras clave: Bombas de eflujo. Resistencia antimicrobiana. Inhibidores de eflujo. Metodologías experimentales.

I. INTRODUÇÃO

A resistência antimicrobiana configura-se atualmente como uma das maiores ameaças à saúde pública global, com impacto direto sobre a morbimortalidade, o tempo de hospitalização e os custos associados ao tratamento de infecções bacterianas. A disseminação acelerada de microrganismos multirresistentes tem comprometido a eficácia de antibióticos tradicionalmente utilizados na prática clínica, limitando significativamente as opções terapêuticas disponíveis e exigindo o uso de fármacos mais tóxicos, caros ou de último recurso (Abrantes *et al.*, 2022).

Diversos mecanismos moleculares estão envolvidos no fenômeno da resistência antimicrobiana, incluindo a produção de enzimas inativadoras de antibióticos, alterações em alvos intracelulares, redução da permeabilidade da membrana externa e a ativação de sistemas de efluxo. Dentre esses, as bombas de efluxo bacterianas destacam-se por sua ampla distribuição entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como por sua capacidade de extrusar uma grande variedade de compostos estruturalmente distintos, conferindo fenótipos de multirresistência (Ghssein *et al.*, 2022).

As bombas de efluxo são proteínas transmembrana que atuam de forma ativa na remoção de substâncias tóxicas do interior da célula bacteriana, utilizando energia proveniente de ATP ou gradientes eletroquímicos. Embora desempenhem papel fisiológico importante na manutenção da homeostase celular e na adaptação a ambientes hostis, em patógenos clinicamente relevantes esses sistemas são frequentemente superexpressos, contribuindo de maneira decisiva para a falha terapêutica (Almeida *et al.*, 2023).

Em espécies como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, as bombas de efluxo não apenas reduzem a concentração intracelular de antibióticos, mas também atuam em sinergia com outros mecanismos de resistência, como a formação de biofilmes e a diminuição da permeabilidade da membrana. Essa interação multifatorial torna o controle de infecções bacterianas ainda mais complexo, especialmente em ambientes hospitalares (Batista *et al.*, 2024).

Nesse contexto, a inibição de bombas de efluxo emergiu como uma estratégia terapêutica promissora para o enfrentamento da resistência antimicrobiana. Os chamados inibidores de bombas de efluxo (IBEs) são compostos capazes de bloquear ou reduzir a atividade desses sistemas, promovendo o acúmulo intracelular de antibióticos e restaurando sua eficácia frente a cepas resistentes. Diferentemente dos antibióticos convencionais, os IBEs atuam como agentes adjuvantes, potencializando terapias já existentes e reduzindo a pressão seletiva para o surgimento de novas resistências (Bezerra *et al.*, 2022).

Nos últimos anos, um número crescente de estudos tem sido dedicado à identificação de IBEs a partir de diferentes fontes, incluindo compostos sintéticos, fármacos reposicionados e produtos naturais. No entanto, a validação da atividade inibitória desses compostos depende fortemente da aplicação de metodologias experimentais adequadas, capazes de distinguir a verdadeira inibição de bombas de efluxo de efeitos inespecíficos, como dano à membrana ou interferência metabólica (Camacho Silvas, 2025).

Dessa forma, a escolha criteriosa e a integração de diferentes abordagens metodológicas são fundamentais para a robustez e a credibilidade dos estudos nessa área. Ensaios fenotípicos, testes fluorimétricos de acúmulo e efluxo, análises moleculares, abordagens genéticas e estudos computacionais têm sido amplamente empregados, cada um contribuindo de maneira complementar para a elucidação do mecanismo de ação dos IBEs (Biagioni *et al.*, 2023).

Assim, esta revisão narrativa tem como objetivo apresentar e discutir de forma abrangente e crítica as principais metodologias utilizadas na análise da inibição de bombas de efluxo bacterianas, destacando aquelas consideradas essenciais em artigos científicos voltados à área de resistência antimicrobiana. Ao reunir e integrar essas abordagens, busca-se fornecer um panorama metodológico que auxilie pesquisadores na condução de estudos mais consistentes, reprodutíveis e relevantes para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas frente ao avanço da multirresistência bacteriana.

2. METODOLOGIA

Este trabalho consiste em uma revisão narrativa da literatura, conduzida com o objetivo de reunir, analisar criticamente e sintetizar evidências científicas relacionadas às metodologias utilizadas para o estudo de bombas de efluxo bacterianas e seus respectivos controles positivos, com foco na avaliação de inibidores de bombas de efluxo como estratégia adjuvante no combate à resistência antimicrobiana.

2.1 Estratégia de busca bibliográfica

A busca dos estudos foi realizada de forma sistemática e reproduzível nas bases de dados Google acadêmico, Scielo, PubMed/MEDLINE, Scopus, Web of Science e ScienceDirect. Foram utilizados descritores controlados e não controlados, combinados por operadores booleanos, incluindo, mas não se limitando a: “efflux pumps”, “efflux pump inhibitors”, “antimicrobial resistance”, “multidrug resistance”, “minimum inhibitory concentration”, “ethidium bromide accumulation”, “membrane permeability” e “biofilm”. As estratégias de busca foram adaptadas às especificidades de cada base de dados.

2.2 Critérios de inclusão e exclusão

4

Foram incluídos artigos originais, revisões e estudos metodológicos publicados em inglês, português ou espanhol, que descrevessem metodologias experimentais ou computacionais para avaliação da inibição da atividade de bombas de efluxo bacterianas, bem como o uso de controles positivos reconhecidos. Foram considerados para inclusão artigos originais e revisões publicadas em periódicos revisados por pares, preferencialmente nos últimos 5 anos. Foram excluídos trabalhos sem descrição metodológica adequada, estudos puramente clínicos sem abordagem mecanística e artigos duplicados entre as bases.

2.3 Seleção e análise dos estudos

A seleção dos artigos foi realizada inicialmente por meio da leitura dos títulos e resumos, seguida da avaliação do texto completo dos estudos potencialmente elegíveis. Os artigos selecionados foram analisados qualitativamente quanto às metodologias empregadas, tipos de ensaios, modelos bacterianos utilizados (Gram-positivos e Gram-negativos) e controles positivos adotados em cada abordagem experimental.

2.4 Classificação das metodologias e controles positivos

As metodologias identificadas foram organizadas em categorias, incluindo: ensaios fenotípicos de modulação da concentração inibitória mínima, ensaios de acúmulo e efluxo de sondas fluorescentes, análises de permeabilidade e integridade de membrana, abordagens moleculares e genéticas, ensaios bioenergéticos e abordagens computacionais *in silico*. Para cada categoria, foram identificados e discutidos os controles positivos mais amplamente utilizados e validados na literatura, tais como clorpromazina, reserpina, verapamil, fenilalanina-arginina β -naftilamida (PA β N), CCCP e cepas bacterianas knockout ou superexpressoras de bombas de efluxo.

2.5 Síntese crítica e organização dos dados

Os dados extraídos dos estudos selecionados foram sintetizados de forma narrativa e comparativa, destacando convergências, divergências metodológicas, limitações experimentais e boas práticas descritas na literatura. Ênfase especial foi dada à importância do uso adequado de controles positivos para a correta interpretação dos resultados e validação dos mecanismos de inibição de bombas de efluxo.

3. DESENVOLVIMENTO

3.1 Fundamentos das Bombas de Efluxo Bacterianas

As bombas de efluxo bacterianas constituem sistemas de transporte ativos localizados na membrana celular, responsáveis pela extrusão de uma ampla variedade de compostos potencialmente tóxicos para o meio extracelular. Esses sistemas desempenham papel fisiológico essencial na sobrevivência bacteriana, contribuindo para a adaptação a ambientes adversos, eliminação de metabólitos indesejáveis e manutenção da homeostase celular (Tuon *et al.*, 2022).

Do ponto de vista estrutural e funcional, as bombas de efluxo são classificadas em cinco grandes famílias: Major Facilitator Superfamily (MFS), Resistance-Nodulation-Division (RND), ATP-Binding Cassette (ABC), Small Multidrug Resistance (SMR) e Multidrug and Toxic Compound Extrusion (MATE). Cada uma dessas famílias apresenta características específicas quanto à arquitetura proteica, fonte de energia utilizada e espectro de substratos reconhecidos (Cristaldo *et al.*, 2022).

As bombas da família RND, amplamente distribuídas em bactérias Gram-negativas, são particularmente relevantes do ponto de vista clínico, uma vez que formam complexos tripartites

que atravessam a membrana interna, o espaço periplasmático e a membrana externa. Esses sistemas são altamente eficientes na extrusão de antibióticos e estão diretamente associados a fenótipos de multirresistência em patógenos como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (Chastre *et al.*, 2022).

Já em bactérias Gram-positivas, as bombas das famílias MFS e ABC desempenham papel central na resistência a diferentes classes de antibióticos. A capacidade dessas bombas de reconhecer múltiplos substratos estruturalmente distintos confere às bactérias uma vantagem adaptativa significativa, dificultando o tratamento de infecções e favorecendo a persistência bacteriana (Colouna *et al.*, 2023).

A superexpressão de bombas de efluxo pode ocorrer em resposta à exposição contínua a antibióticos, desinfetantes e outros agentes químicos, sendo frequentemente regulada por sistemas complexos de controle transcricional. Assim, a compreensão dos fundamentos estruturais, energéticos e regulatórios dessas bombas é essencial para o desenvolvimento racional de estratégias de inibição eficazes (Dalmolin *et al.*, 2022).

As metodologias fenotípicas constituem a base inicial para a investigação da inibição de bombas de efluxo, sendo amplamente utilizadas devido à sua simplicidade, reprodutibilidade e aplicabilidade em diferentes espécies bacterianas. Esses ensaios permitem avaliar, de forma indireta, o impacto funcional de compostos sobre a resistência mediada por efluxo (Da Silva *et al.*, 2025).

3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) na Presença de Inibidores de Efluxo

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de antibióticos na presença e ausência de potenciais inibidores de bombas de efluxo é considerada uma abordagem essencial em estudos da área. A redução significativa da CIM de antibióticos reconhecidos como substratos de bombas de efluxo é interpretada como indicativo de modulação da resistência (Da Luz Ferreira *et al.*, 2022).

Como controles positivos clássicos para esse tipo de ensaio, destacam-se compostos bem descritos na literatura como inibidores de efluxo, incluindo clorpromazina, reserpina, verapamil, fenilalanina-arginina β -naftilamida (PA β N) e carbonil cianeto m-clorofenil hidrazona (CCCP). A utilização desses controles permite validar o sistema experimental e comparar a eficácia relativa de novos compostos (Da Silva Costa *et al.*, 2023).

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de antibióticos na presença e na ausência de potenciais inibidores de bombas de efluxo constitui uma abordagem amplamente empregada para a investigação de mecanismos de resistência bacteriana e de estratégias voltadas à modulação da atividade antimicrobiana. As bombas de efluxo atuam como sistemas de transporte transmembrana capazes de extrusar diversos antibióticos para o meio extracelular, reduzindo sua concentração intracelular e, conseqüentemente, sua eficácia terapêutica. Nesse contexto, a avaliação comparativa da CIM permite inferir se um composto testado é capaz de interferir nesse mecanismo, promovendo o acúmulo intracelular do antibiótico e restaurando sua atividade frente a cepas resistentes (De Oliveira *et al.*, 2022).

Metodologicamente, a CIM do antibiótico é inicialmente determinada de forma isolada, geralmente por microdiluição em caldo, seguindo protocolos padronizados. Em seguida, avalia-se a CIM do potencial inibidor de efluxo para assegurar que a concentração empregada nos ensaios combinados seja subinibitória e não exerça efeito antimicrobiano significativo por si só. Posteriormente, a CIM do antibiótico é novamente determinada na presença do modulador, em concentração fixa, possibilitando a comparação direta entre os valores obtidos nas diferentes condições experimentais (Silva *et al.*, 2024).

A redução significativa da CIM de antibióticos reconhecidos como substratos de bombas de efluxo, como fluoroquinolonas, tetraciclina e cloranfenicol, é interpretada como um indicativo de modulação da resistência mediada por efluxo. Reduções de duas a quatro vezes já podem ser consideradas relevantes, enquanto diminuições mais expressivas reforçam a hipótese de inibição eficiente desses sistemas de transporte. Para garantir a confiabilidade dos resultados, é comum a inclusão de inibidores de efluxo de referência, bem como a utilização de cepas com expressão conhecida desses mecanismos (Silva *et al.*, 2024).

Embora essa abordagem seja considerada robusta e amplamente aceita como ferramenta de triagem, a redução da CIM não permite, de forma isolada, a confirmação definitiva do mecanismo de ação como inibição de bombas de efluxo. Efeitos adicionais, como alterações na permeabilidade da membrana bacteriana ou interações farmacodinâmicas inespecíficas, podem contribuir para o fenômeno observado. Assim, os resultados obtidos por meio da determinação da CIM em ensaios combinados são frequentemente complementados por testes adicionais, como ensaios de acúmulo intracelular de corantes e análises de expressão gênica. Ainda assim, essa metodologia representa um passo fundamental na identificação e caracterização de compostos capazes de atuar como moduladores da resistência antimicrobiana, com elevado

potencial de aplicação no desenvolvimento de terapias adjuvantes mais eficazes (De Albuquerque *et al.*, 2022).

3.2.1 Clorpromazina (CPZ)

A clorpromazina é um antipsicótico da classe das fenotiazinas que apresenta atividade inibitória sobre sistemas de efluxo bacterianos, especialmente bombas da família MFS (Major Facilitator Superfamily). Seu mecanismo de ação envolve a desestabilização da membrana citoplasmática, com consequente alteração do potencial de membrana e da fluidez lipídica, o que compromete a eficiência do transporte ativo de fármacos. Além disso, a CPZ pode interagir diretamente com proteínas transportadoras, reduzindo a extrusão de antibióticos e promovendo sua acumulação intracelular (De Melo Santana *et al.*, 2022).

3.2.2 Reserpina

A reserpina é um alcaloide indólico amplamente descrito como inibidor clássico de bombas de efluxo, sobretudo em bactérias Gram-positivas. Seu mecanismo de ação baseia-se na ligação direta aos sítios de reconhecimento de substrato das bombas de efluxo, principalmente da família MFS, competindo com os antimicrobianos e impedindo sua expulsão celular. Esse bloqueio resulta no aumento da concentração intracelular de fármacos e na reversão parcial do fenótipo de resistência mediado por efluxo (Tamma *et al.*, 2022).

3.2.3 Verapamil

O verapamil, um bloqueador de canais de cálcio do tipo L, é amplamente utilizado como inibidor funcional de bombas de efluxo em bactérias e micobactérias. Seu mecanismo envolve a interferência no gradiente eletroquímico de prótons e a inibição direta de transportadores dependentes de energia, reduzindo a atividade de bombas de efluxo, especialmente aquelas associadas à resistência a múltiplos fármacos. Em *Mycobacterium tuberculosis*, o verapamil é conhecido por potencializar a atividade de antibióticos ao aumentar sua retenção intracelular (De Sousa *et al.*, 2022).

3.2.4 Fenilalanina-arginina β -naftilamida (PA β N)

A PA β N é um inibidor peptidomimético amplamente utilizado como controle positivo em bactérias Gram-negativas. Seu mecanismo de ação consiste principalmente na inibição competitiva de bombas de efluxo da família RND (Resistance-Nodulation-Division), como

MexAB-OprM em *Pseudomonas aeruginosa*. A PA β N se liga ao sítio de reconhecimento de substrato dessas bombas, impedindo a extrusão de antibióticos e aumentando sua concentração intracelular. Além disso, há evidências de que a PA β N pode causar leve permeabilização da membrana externa, contribuindo para o aumento da susceptibilidade bacteriana (De Souza *et al.*, 2023).

3.2.5 Carbonil cianeto m-clorofenil hidrazona (CCCP)

O CCCP é um desacoplador clássico da fosforilação oxidativa e atua como colapsador da força próton-motriz (PMF). Seu mecanismo de ação baseia-se na dissipação do gradiente de prótons através da membrana citoplasmática, essencial para o funcionamento de bombas de efluxo dependentes de energia, especialmente aquelas das famílias MFS e RND. Ao abolir a fonte energética do transporte ativo, o CCCP inibe de forma indireta e não específica a atividade das bombas de efluxo, resultando no acúmulo intracelular de antimicrobianos (De Souza *et al.*, 2025). É fundamental que os controles positivos sejam utilizados em concentrações subinibitórias, de modo a evitar efeitos bactericidas diretos que possam mascarar a interpretação dos resultados. Além disso, a inclusão de controles negativos, como solventes ou veículos, é indispensável para garantir a confiabilidade dos dados obtidos (De Pinho *et al.*, 2024).

3.3 Ensaios Baseados em Acúmulo e Efluxo de Substratos Fluorescentes

Os ensaios fluorimétricos constituem uma das abordagens mais robustas, sensíveis e informativas para a avaliação funcional direta da atividade de bombas de efluxo bacterianas. Essas metodologias baseiam-se no uso de substratos fluorescentes reconhecidos por múltiplos sistemas de efluxo, permitindo o monitoramento em tempo real do equilíbrio dinâmico entre o influxo passivo, o acúmulo intracelular e a extrusão ativa desses compostos pelas células bacterianas viáveis (Gamboa *et al.*, 2022).

Entre os métodos disponíveis, o ensaio de acúmulo de etídio brometo (EtBr) é amplamente empregado e considerado um padrão experimental para a investigação da atividade de bombas de efluxo. O etídio brometo é uma molécula catiônica, hidrofílica e substrato comum de diversas famílias de bombas de efluxo, incluindo transportadores das famílias RND, MFS e SMR. Em solução aquosa, o EtBr apresenta baixa fluorescência; no entanto, ao penetrar na célula bacteriana e intercalar-se ao DNA, ocorre um aumento significativo de sua emissão fluorescente, o que permite a quantificação indireta de seu acúmulo intracelular (Ghssein *et al.*, 2022).

No protocolo experimental, suspensões bacterianas padronizadas são incubadas com concentrações subinibitórias de EtBr, na ausência ou presença dos compostos testados. A fluorescência é monitorada continuamente por fluorimetria, geralmente utilizando comprimentos de onda de excitação e emissão em torno de 530 nm e 590 nm, respectivamente. Em condições basais, células com bombas de efluxo funcionais mantêm baixos níveis de fluorescência intracelular, devido à extrusão ativa do EtBr (Harding *et al.*, 2023).

O aumento dependente do tempo da fluorescência intracelular, observado após a adição do composto em teste, é interpretado como indicativo de redução da atividade de efluxo, resultante da inibição direta da bomba transportadora ou da interferência nos mecanismos energéticos que sustentam o transporte ativo. A análise cinética dos perfis de fluorescência permite distinguir entre inibição rápida e direta da bomba e efeitos indiretos associados à dissipação da força próton-motriz ou ao comprometimento metabólico celular (Krell *et al.*, 2024).

A robustez interpretativa do ensaio é ampliada pela utilização de controles positivos bem estabelecidos. A clorpromazina é frequentemente empregada como controle de inibição funcional direta de bombas da família MFS, promovendo aumento gradual e sustentado da fluorescência intracelular. O CCCP (carbonil cianeto m-clorofenil hidrazona) é utilizado como controle de colapso energético, atuando como desacoplador da força próton-motriz e levando a um aumento rápido e pronunciado da fluorescência, associado à inibição indireta, porém completa, do efluxo dependente de prótons. A comparação dos perfis cinéticos obtidos com os compostos testados e com esses controles permite inferir o mecanismo predominante de inibição (Jotic *et al.*, 2024).

Além disso, esses ensaios possibilitam análises quantitativas, como o cálculo da taxa de acúmulo de EtBr, da área sob a curva (AUC) ou do nível máximo de fluorescência, fornecendo parâmetros objetivos para a comparação da eficácia relativa entre diferentes inibidores de bombas de efluxo. Quando combinados com ensaios complementares de integridade de membrana e avaliação de parâmetros energéticos celulares, os ensaios fluorimétricos oferecem uma abordagem integrada e confiável para a caracterização funcional de inibidores de bombas de efluxo e para a identificação de compostos com maior seletividade e potencial aplicação como adjuvantes antimicrobianos (Láscaris *et al.*, 2022).

3.4 Análise de Expressão Gênica

A quantificação da expressão de genes codificadores de bombas de efluxo por meio da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real após transcrição reversa (RT-qPCR) representa uma abordagem complementar de grande relevância. Essa técnica possibilita avaliar alterações nos níveis de transcrição de genes associados a sistemas de efluxo, como *acrA*, *acrB*, *tolC*, *mexA*, *mexB* e *oprM*, em resposta à exposição a potenciais IBEs (Magalhães *et al.*, 2025).

A análise da expressão gênica permite distinguir se a redução da atividade de efluxo observada em ensaios funcionais decorre de uma inibição direta da bomba ou de uma modulação transcricional, como repressão da expressão gênica ou interferência em reguladores globais e locais. Além disso, a RT-qPCR pode revelar respostas adaptativas da bactéria, como a indução compensatória de genes de efluxo frente à presença do inibidor, fenômeno frequentemente associado à tolerância e à persistência bacteriana (Nikolic *et al.*, 2022). Quando associada a controles internos adequados (genes constitutivos) e a análises estatísticas robustas, essa metodologia fornece dados quantitativos confiáveis, contribuindo para a compreensão dos efeitos moleculares dos IBEs e de seu impacto na regulação genética bacteriana (Sathe *et al.*, 2023).

3.5 Uso de Cepas Mutantes ou Knockout

A utilização de cepas bacterianas geneticamente modificadas, com deleção (*knockout*), superexpressão ou mutações pontuais em genes codificadores de bombas de efluxo, constitui uma estratégia poderosa para confirmar o envolvimento específico desses sistemas nos efeitos observados. A comparação entre cepas selvagens (*wild-type*) e mutantes permite estabelecer relações causais entre a presença funcional da bomba e a atividade moduladora do composto testado (Shaaban *et al.*, 2023).

Por exemplo, a perda do efeito sinérgico de um antibiótico na presença do IBE em cepas *knockout* sugere fortemente que a ação do composto depende da integridade da bomba de efluxo alvo. De forma complementar, cepas com superexpressão desses genes podem ser utilizadas para avaliar a capacidade do IBE em reverter fenótipos de resistência exacerbados. Essas abordagens genéticas fornecem evidências robustas e específicas do mecanismo de ação dos IBEs, minimizando interpretações equivocadas associadas a efeitos inespecíficos, como alterações na permeabilidade da membrana ou citotoxicidade geral (Tamma *et al.*, 2022).

3.6 Ensaios Bioquímicos e de Energia Celular

Muitas bombas de efluxo bacterianas são sistemas de transporte ativo cuja funcionalidade depende diretamente de fontes energéticas celulares. Bombas pertencentes à família ABC (ATP-Binding Cassette) utilizam a hidrólise de ATP como fonte direta de energia, enquanto transportadores das famílias RND (Resistance-Nodulation-Division), MFS (Major Facilitator Superfamily) e SMR (Small Multidrug Resistance) dependem da força próton-motriz (PMF), gerada pelo gradiente eletroquímico transmembrana, resultante da diferença de potencial elétrico ($\Delta\Psi$) e do gradiente de pH (ΔpH) (Paz *et al.*, 2025).

Nesse contexto, a investigação do mecanismo de ação de potenciais inibidores de bombas de efluxo (IBEs) deve ser aprofundada por meio de ensaios bioquímicos e biofísicos voltados à avaliação do estado energético celular. A mensuração dos níveis intracelulares de ATP é realizada utilizando métodos baseados em bioluminescência dependente de luciferase, permitindo quantificar alterações no metabolismo energético após a exposição aos compostos testados. Como controle positivo para a inibição específica de ATPases, deve ser utilizado ortovanadato de sódio, enquanto o arsenato de sódio é empregado como controle de redução metabólica global de ATP. Reduções significativas nos níveis de ATP são interpretadas como indicativas de interferência inespecífica no metabolismo celular ou de inibição de processos respiratórios, com impacto indireto sobre bombas do tipo ABC (De Sá *et al.*, 2025).

12

Adicionalmente, a avaliação do potencial de membrana ($\Delta\Psi$) é conduzida empregando sondas fluorescentes sensíveis à voltagem, como DiSC₃(5) ou rhodamine 123. A valinomicina, na presença de potássio, deve ser utilizada como controle positivo para a dissipação seletiva do $\Delta\Psi$, enquanto o CCCP (carbonil cianeto m-clorofenil hidrazona) é empregado como controle de colapso energético não seletivo. A dissipação do potencial de membrana é considerada indicativa de comprometimento da integridade da PMF, fator essencial para o funcionamento de bombas de efluxo dependentes de prótons (Compagne *et al.*, 2023).

De forma complementar, o pH intracelular (ΔpH) deve ser avaliado utilizando corantes fluorescentes sensíveis ao pH, como BCECF-AM. A nigericina, na presença de potássio, é utilizada como controle positivo para o colapso seletivo do gradiente de pH, permitindo validar a sensibilidade do ensaio à dissipação do ΔpH sem perda imediata da integridade da membrana (Zhang *et al.*, 2024).

A integridade global da força próton-motriz deve ser inferida a partir da análise combinada dos parâmetros $\Delta\Psi$ e ΔpH , permitindo distinguir compostos que atuam como

desacopladores energéticos clássicos, como o CCCP, daqueles que não afetam diretamente a geração de energia celular. Ensaio de integridade de membrana devem ser realizados em paralelo, utilizando iodeto de propídio ou SYTOX Green, sendo a polimixina B empregada como controle positivo de permeabilização de membrana em bactérias Gram-negativas, e Triton X-100 como controle de lise máxima (Karunanathie *et al.*, 2022).

A interpretação integrada desses dados é fundamental para a caracterização mecanística dos compostos testados. Reduções globais nos níveis de ATP, colapso do potencial de membrana ou acidificação intracelular foram interpretadas como indicativas de um mecanismo de ação inespecífico, associado à interferência no metabolismo energético e em múltiplos processos fisiológicos bacterianos. Em contraste, a manutenção dos parâmetros energéticos celulares, concomitante à diminuição da atividade de efluxo observada em ensaios funcionais (como acúmulo de etídio brometo ou Nile Red, validados com PA β N ou reserpina como controles positivos), sugeriu um mecanismo de inibição mais seletivo, possivelmente decorrente da interação direta do composto com a proteína transportadora (Mcdonald *et al.*, 2024).

Assim, a combinação de ensaios energéticos, testes de integridade de membrana e ensaios funcionais de efluxo, validados por controles positivos apropriados, fornecem uma abordagem robusta para a discriminação entre inibidores verdadeiros de bombas de efluxo e compostos com efeitos metabólicos indiretos, favorecendo a identificação de candidatos com maior seletividade farmacológica e menor potencial de toxicidade, características desejáveis no desenvolvimento de adjuvantes antimicrobianos (Hou *et al.*, 2023).

3.7 Abordagens Computacionais e *In Silico*

As abordagens computacionais, incluindo modelagem molecular, *docking* e simulações de dinâmica molecular, têm desempenhado um papel cada vez mais relevante na investigação de IBEs. Essas metodologias permitem prever a interação entre potenciais moduladores e estruturas tridimensionais de proteínas de efluxo, identificando sítios de ligação, interações-chave e conformações favoráveis à inibição (Paggi, 2024).

O *docking* molecular auxilia na triagem virtual de grandes bibliotecas de compostos, reduzindo custos e tempo experimental, enquanto a dinâmica molecular fornece informações sobre a estabilidade do complexo ligante-proteína e sobre mudanças conformacionais induzidas pelo ligante ao longo do tempo. Essas análises contribuem para a compreensão do mecanismo molecular de inibição, seja por bloqueio do canal de transporte, interferência na ligação do

substrato ou alteração da dinâmica conformacional da bomba. Embora não substituam ensaios experimentais *in vitro* e *in vivo*, as metodologias *in silico* representam ferramentas valiosas para o desenho racional de novos IBEs, otimização estrutural de compostos promissores e geração de hipóteses mecanísticas que podem ser posteriormente validadas experimentalmente (Muhammed, 2024).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise da inibição de bombas de efluxo bacterianas constitui um eixo central na pesquisa contemporânea em resistência antimicrobiana. A escolha criteriosa e a integração de metodologias fenotípicas, fluorimétricas, moleculares, bioquímicas e computacionais são essenciais para a validação de novos inibidores. Artigos científicos voltados a essa área devem contemplar um conjunto mínimo de ensaios que permitam não apenas observar a modulação da atividade antibiótica, mas também compreender os mecanismos envolvidos. Dessa forma, a adoção de estratégias metodológicas robustas contribuirá de maneira decisiva para o desenvolvimento de terapias antimicrobianas mais eficazes frente ao avanço da multirresistência bacteriana.

REFERÊNCIAS

- ABRANTES, Jaime Antonio; DA ROCHA NOGUEIRA, Joseli Maria. Biofilme e células persisters: da persistência à resistência microbiana. *RBAC*, v. 54, n. 3, p. 228-234, 2022.
- ALMEIDA, Wesley Natam Martins et al. Impactos da utilização de antimicrobianos na resistência antimicrobiana: uma revisão de literatura com abordagem da saúde única. *Revista Universitária Brasileira*, v. 1, n. 2, 2023.
- BATISTA, Paulo Henrique Mariano et al. Implicações da resistência antimicrobiana na prática clínica. *International Journal of Health Management Review*, v. 10, n. 1, p. e356-e356, 2024.
- BEZERRA, Raquel Vieira et al. Avaliação da atividade antibacteriana do monoterpeno (r)-(+)-citronelal contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, v. 51, n. 2, p. 691-702, 2022.
- BIAGIONI, M. C. et al. Identificação de Enterobactérias e Resistência Antimicrobiana em Maritacas (*Psittacara leucophthalmus*) de Vida Livre. *Ars Veterinaria*, v. 39, n. 4, p. 105-109, 2023.
- CAMACHO SILVAS, Luis Arturo. Resistencia bacteriana, una crisis actual. *Revista Española de salud pública*, v. 97, p. e202302013, 2025.

CHASTRE, Jean et al. Safety, efficacy, and pharmacokinetics of gremubamab (MEDI3902), an anti-Pseudomonas aeruginosa bispecific human monoclonal antibody, in P. aeruginosa-colonised, mechanically ventilated intensive care unit patients: a randomised controlled trial. *Critical care*, v. 26, n. 1, p. 355, 2022.

COLOUNA, Amanda Alves Teodoro et al. O uso indiscriminado de antibióticos na resistência bacteriana infantil. *Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação*, v. 9, n. 9, p. 3686-3695, 2023.

CRISTALDO, Yasmim Cabral; IRMÃO, Mariana Ojeda Souza; MATUO, Renata. O uso indiscriminado de antibióticos e sua relação com a resistência bacteriana. *Tópicos especiais em ciências da saúde: teoria, métodos e práticas*, v. 5, n. 1, p. 117-128, 2022.

COMPAGNE, Nina et al. Update on the discovery of efflux pump inhibitors against critical priority Gram-negative bacteria. *Antibiotics*, v. 12, n. 1, p. 180, 2023.

DALMOLIN, Jaqueline et al. Mecanismos de expressão de resistência aos antibióticos e saúde pública. *Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR*, v. 26, n. 3, 2022.

DA SILVA, Patriky Pereira et al. Atividade antibiofilme dos óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* e *Mentha piperita* frente *Aeromonas* spp. isoladas do peixe amazônico Tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, v. 25, n. 5, p. e20117-e20117, 2025.

DA LUZ FERREIRA, Diógenes et al. Controle de qualidade e avaliação da atividade antimicrobiana in vitro de amostras comerciais do óleo essencial de *Mentha piperita* L. sobre *E. coli*. *Revista RG News*, v. 8, p. 2, 2022

DA SILVA COSTA, Ester et al. Fitopatometria da murcha bacteriana em gerações de tomateiro. *Diversitas Journal*, v. 8, n. 4, p. 3147-3158, 2023.

DE ALBUQUERQUE, Alessandra Vieira et al. Estratégias associadas a prevenção da resistência de antimicrobianos no âmbito hospitalar: Revisão sistemática. *Research, Society and Development*, v. 11, n. 7, p. e23811729990-e23811729990, 2022.

DE MELO SANTANA, Hortência Biatriz; DE SOUZA MONTEIRO, Andréa. Comparação do mecanismo de heterorresistência em *Serratia marcescens* por time kill curve frente ao meropeném. *RBAC*, v. 54, n. 1, p. 50-54, 2022

DE OLIVEIRA, Anselmo Gomes; SILVEIRA, Damaris. Resistência microbiana a antibióticos: um desafio global de difícil resolução. *Infarma-Ciências Farmacêuticas*, v. 34, n. 3, p. 199-201, 2022.

DE SÁ, Hiandrey Sabrina Torres et al. Detecção de bomba de efluxo em espécies de *Staphylococcus coagulase negativa* isoladas de mastite caprina. *Pubvet*, v. 19, n. 03, p. e1745-e1745, 2025.

DE SOUSA, Aline et al. Géis, extratos naturais e nanopartículas de Ag para ação bactericida. *Brazilian Journal of Development*, v. 8, n. 1, p. 7989-8001, 2022.

DE SOUZA, Regivaldo Silva et al. Baixa concentração de trans-resveratrol inibe o crescimento e formação de biofilme de *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02. *Brazilian Applied Science Review*, v. 7, n. 2, p. 416-428, 2023.

DE SOUZA, Marcos; CORTEZ, Lumena Cristina; MANCA, Ricardo. Resistência microbiana na perspectiva da saúde pública e ambiental. *Revista Interciência e Sociedade*, v. 10, n. extra, 2025.

DE PINHO, Lucimary Leite et al. Uso indiscriminado de antibióticos e o risco de resistência bacteriana: revisão de literatura. *Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences*, v. 6, n. 1, p. 438-452, 2024.

GAMBOA, Yoel López et al. Resistencia microbiana a los antibióticos: um problema de salud creciente. *Revista Científica Hallazgos21*, v. 7, n. 1, p. 103-114, 2022.

GHSSEIN, Ghassan; EZZEDDINE, Zeinab. A review of *Pseudomonas aeruginosa* metallophores: Pyoverdine, pyochelin and pseudopaline. *Biology*, v. 11, n. 12, p. 1711, 2022.

HARDING, Christopher John et al. An anti-biofilm cyclic peptide targets a secreted aminopeptidase from *P. aeruginosa*. *Nature Chemical Biology*, v. 19, n. 9, p. 1158-1166, 2023.

HOU, Ying et al. Droplet-based digital PCR (ddPCR) and its applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 158, p. 116897, 2023.

KRELL, Tino; MATILLA, Miguel A. *Pseudomonas aeruginosa*. *Trends in microbiology*, v. 32, n. 2, p. 216-218, 2024.

JOTIC, Ana et al. Antibiofilm Effects of Novel Compounds in Otitis Media Treatment: Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, n. 23, p. 12841, 2024.

KARUNANATHIE, Harsheni et al. PCR enhancers: Types, mechanisms, and applications in long-range PCR. *Biochimie*, v. 197, p. 130-143, 2022.

LÁSCARIS, Matheus Péricles Silva et al. Sinergismo microbiano entre óleos essenciais e conservantes sintéticos utilizados na indústria de alimentos. *Research, Society and Development*, v. 11, n. 3, p. e32011326535-e32011326535, 2022.

MAGALHÃES, Vanessa et al. Desafios no combate à resistência antimicrobiana: Abordagem global e local. *Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences*, v. 7, n. 1, p. 248-257, 2025.

MATTIONI, Alícia Christmann; JUNIOR, Luiz Fernando Rodrigues. Modificações da superfície de titânio: revisão de métodos e seu efeito osteointegrador e antibiofilme. *Disciplinarum Scientia| Naturais e Tecnológicas*, v. 23, n. 1, p. 59-74, 2022.

MCDONALD, Caitlin; TAYLOR, Duncan; LINACRE, Adrian. PCR in forensic science: a critical review. *Genes*, v. 15, n. 4, p. 438, 2024.

MUHAMMED, Muhammed T.; AKI-YALCIN, Esin. Molecular docking: principles, advances, and its applications in drug discovery. *Letters in Drug Design & Discovery*, v. 21, n. 3, p. 480-495, 2024.

NIKOLIC, Isidora et al. Um método de tabuleiro de xadrez otimizado para detecção de sinergia fago-antibiótico. *Viruses*, v. 14, n. 7, p. 1542, 2022.

TUON, Felipe Francisco et al. Pathogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: a review. *Pathogens*, v. 11, n. 3, p. 300, 2022.

SATHE, Nikhil et al. *Pseudomonas aeruginosa*: Infections and novel approaches to treatment “Knowing the enemy” the threat of *Pseudomonas aeruginosa* and exploring novel approaches to treatment. *Infectious medicine*, v. 2, n. 3, p. 178-194, 2023.

SILVA, Thaynara O. et al. Bacterial efflux pump OMPs as vaccine candidates against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 116, n. 6, p. 1237-1253, 2024.

SHAABAN, Mohamed T.; ZAYED, Muhammad; SALAMA, Hussein S. Antibacterial potential of bacterial cellulose impregnated with green synthesized silver nanoparticle against *S. aureus* and *P. aeruginosa*. *Current Microbiology*, v. 80, n. 2, p. 75, 2023.

SHARMA, Saroj et al. Different efflux pump systems in *Acinetobacter baumannii* and their role in multidrug resistance. *Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health: Volume 17*, p. 155-168, 2023.

TAMMA, Pranita D. et al. Infectious Diseases Society of America 2022 guidance on the treatment of extended-spectrum β -lactamase producing *Enterobacterales* (ESBL-E), carbapenem-resistant *Enterobacterales* (CRE), and *Pseudomonas aeruginosa* with difficult-to-treat resistance (DTR-*P. aeruginosa*). *Clinical Infectious Diseases*, v. 75, n. 2, p. 187-212, 2022.

PAGGI, Joseph M.; PANDIT, Ayush; DROR, Ron O. The art and science of molecular docking. *Annual review of biochemistry*, v. 93, n. 1, p. 389-410, 2024.

PAZ, Isabel Cristina Padula et al. Cinética de crescimento de *Bacillus amyloliquefasciens* 0129 em diferentes concentrações de sacarose e extrato de levedura. *Acta Biologica Brasiliensia*, v. 8, n. 2, p. 69-81, 2025.

ZHANG, Lan et al. Bacterial efflux pump inhibitors reduce antibiotic resistance. *Pharmaceutics*, v. 16, n. 2, p. 170, 2024.