REVISTA SAÚDE DOS VALES

ISSN: 2674-8584 V.11 – N.1 – 2024

TÉCNICAS *in vitro* PARA AVALIAÇÃO DE POTENCIAIS INIBIDORES DA BOMBA DE EFLUXO NORA EM *Staphylococcus aureus*: UMA BREVE REVISÃO

In Vitro TECHNIQUES FOR EVALUATING POTENTIAL NORA EFFLUX PUMP INHIBITORS IN Staphylococcus aureus: A BRIEF REVIEW

Ronaldo dos Santos Machado; Gustavo Pozza Silveira
Programa de pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
E-mail: ronaldo.bmd@gmail.com
E-mail: gustavo.silveira@iq.ufrgs.br

RESUMO

O uso de antimicrobianos revolucionou a medicina, mas o uso excessivo tem levado ao aumento da resistência antimicrobiana (RAM), particularmente em bactérias como Staphylococcus aureus. A proteína NorA, uma bomba de efluxo da superfamília dos facilitadores principais (SPF), desempenha um papel crucial na resistência bacteriana ao expelir antimicrobianos do interior celular, tornando-os ineficazes. Esta revisão integrativa analisa metodologias in vitro para avaliar inibidores de bomba de efluxo (EPIs) que atuam sobre a NorA, destacando seu potencial para restaurar a eficácia terapêutica e controlar infecções causadas por *S. aureus* multirresistente.

Palavras - Chave: Antimicrobianos; resistência; infecções; bombas de efluxo; inibidores.

ABSTRACT

The use of antimicrobials revolutionized medicine, but excessive use has led to an increase in antimicrobial resistance (AMR), particularly in bacteria such as Staphylococcus aureus. The NorA protein, an efflux pump from the major facilitator superfamily (MFS), plays a crucial role in bacterial resistance by expelling antimicrobials from the cell, rendering them ineffective. This integrative review analyzes in vitro methodologies for evaluating efflux pump inhibitors (EPIs) that target NorA, highlighting their potential to restore therapeutic efficacy and control infections caused by multidrug-resistant *S. aureus.*

Key words: Discovery; Antibiotics; Resistance; Efflux; Inhibitors.

1. INTRODUÇÃO

A descoberta e o uso de antimicrobianos representaram um dos mais significativos progressos na medicina, evitando a perda de inúmeras vidas devido a infecções bacterianas (LOBANOVSKA; PILLA, 2017). As substâncias antimicrobianas, como os antibióticos e os

quimioterápicos antimicrobianos, pertencem a diversos grupos de medicamentos utilizados no tratamento de uma ampla gama de infecções, incluindo aquelas de origem bacteriana (MEDINA; PIEPER, 2016).

Algumas bactérias possuem naturalmente mecanismos de resistência aos antimicrobianos (RAM), enquanto outras foram sendo selecionada em resposta à exposição a esses agentes. Ao longo do tempo, o uso excessivo e exacerbado desses medicamentos tem contribuído para o surgimento de diversos mecanismos de resistência em bactérias, incluindo aquelas pertencentes ao grupo das enterobactérias, resultando no aparecimento de bactérias multirresistentes (BMR) (SOWOLE, MING, DAVIES, 2018).

Com o surgimento das BMR ao longo dos anos, os arsenais de drogas antimicrobianas tornaram-se progressivamente menos eficazes no combate às infecções provocadas por esses microrganismos. Isso gerou um alerta global devido ao grave problema de saúde pública causado pelas infecções por essas bactérias, resultando em elevados custos com a longa permanência de pacientes em ambientes de saúde, bem como no investimento em cuidados de alta complexidade que muitos enfermos demandam (FERRI et al., 2017).

Bombas de efluxo são proteínas encontradas na membrana bacteriana que expeliram ativamente substâncias tóxicas, como antibióticos, do ambiente intracelular, tanto em bactérias Gram-positivas quanto em Gram-negativas. Elas podem ser bombas de resistência específica (RE) ou de resistência múltipla (RM), afetando a ação de uma ou mais classes de antimicrobianos e compostos estruturalmente relacionados (DE MORAIS et al., 2021).

A bomba de efluxo (BE) NorA é um dos sistemas de efluxo mais bem estudados em *Staphylococcus aureus* (MUNIZ et al., 2021). Pertencente à superfamília dos principais facilitadores (SPF), essa proteína contém 388 aminoácidos e 12 segmentos transmembranares, sendo codificada pelo gene cromossômico norA, descrito pela primeira vez em uma cepa resistente à fluoroquinolona isolada em 1986 (UBUKATA; ITOH-YAMASHITA; KONNO, 1989).

Essa proteína foi identificada em diversas cepas de S. aureus, sendo a mais estudada a cepa SA-1199, considerada de tipo selvagem e que expressa NorA de forma induzível, e sua mutante ou derivada SA-1199B, que superexpressa essa proteína de forma constitutiva (DE MORAIS et al., 2021).

Certas substâncias de origem biológica ou sintética foram descritas como agentes bloqueadores de bombas de efluxo, conhecidos como *efflux pump inhibitors* (EPIs) ou inibidores de bomba de efluxo (IBE), que têm a capacidade de inibir a ação dessas estruturas em expelir substâncias nocivas da célula microbiana, como os antimicrobianos. Partindo desse contexto, o uso de substâncias inibidoras de bombas de efluxo tem o potencial de reverter resistências antimicrobianas relacionadas a elas (PEREIRA DA CRUZ et al., 2020).

2. OBJETIVOS

Dada a relevância dos estudos de elucidação e avaliação de potenciais inibidores de bombas de efluxo, especialmente com foco na NorA, esta revisão visa compilar metodologias eficazes utilizadas na avaliação e prospecção de compostos de interesse antimicrobiano, conforme relatado na literatura dos últimos anos.

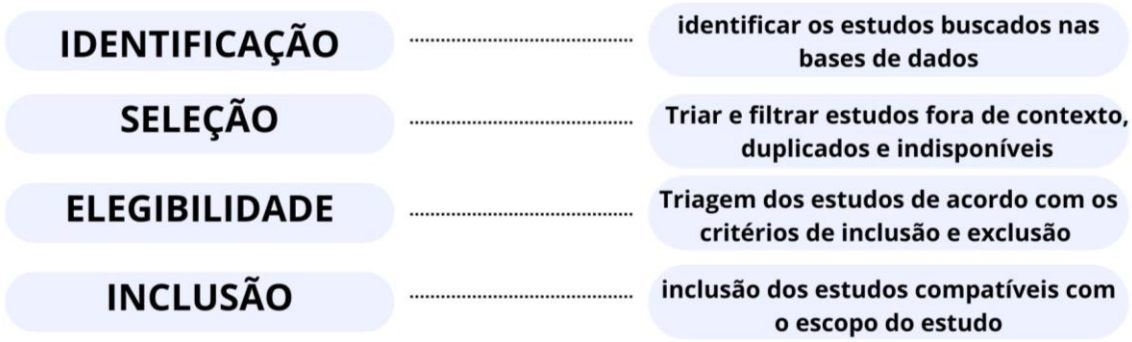
3. REVISÃO DA LITERATURA

REVISTA SAÚDE DOS VALES

Para a execução desde estudo, foi adotado uma abordagem metodológica de revisão de literatura do tipo integrativa, com ênfase na análise qualitativa. De acordo com Whittemore e colaboradores (2005), a revisão integrativa é uma metodologia de revisão que possibilita uma maior flexibilidade ao permitir incorporar estudos de diversas metodologias, possibilitando, assim, uma ampla avaliação dos tópicos estudados. Isso permite uma abordagem de maior abrangência dos fenômenos relacionados ao tema em questão.

Com a intenção de manter a integridade cientifica deste estudo, seguimos as recomendações preconizadas pelo PRISMA (Principais Itens para Relatar Revisões Sistemáticas e Meta-análises). A seleção dos estudos foi realizada em conformidade com as etapas ilustradas na figura 1, a seguir, seguindo a abordagem ISEI conforme preconizado pelo PRISMA.

Figura 1. Abordagem ISEI preconizada pelo PRISMA.



Fonte: autores do estudo.

Uma revisão bibliográfica de caráter integrativo tem como foco especifico responder uma pergunta previamente definida por meio de uma hipótese cientifica. Assim, esse processo envolve a aplicação de metodologias explicitas e sistemáticas para a realização da identificação, busca e avalição dos trabalhos científicos. A partir disso é possível então a discussão dos dados coletados e a criação de uma nova perspectiva do assunto estudado (BOTELHO, CUNHA, MACEDO, 2011).

Partindo deste contexto a pergunta norteadora deste estudo foi formulada utilizando a estratégia PICO, Ministério da saúde (2020), conforme ilustrado na figura 1, resultando na seguinte indagação: Qual a importância da bomba de efluxo NorA na resistência aos antimicrobianos em *S. aureus* e o que se tem de atual no que se trata de inibidores?

Figura 1. Estratégia PECO atribuída na formulação da pergunta norteadora.

Acrônimo	Definição do acrônimo	Descrição
P	População/problema	Cepas de *Staphylococcus aureus* superexpressa de NorA.
I	intervenção	Inibição da bomba de efluxo NorA.
C	Comparação	Diferentes potenciais inibidores
O	Desfecho/Resultado	Alteração na resistência aos antibióticos, recuperação das sucetibilidade.

Fonte: Autor do estudo, 2024.

Busca de trabalhos científicos

A busca de trabalhos científicos foi conduzida nas bases de estudos SCOPUS, PUBMED e SciELO, utilizando como palavras-chaves: “‘*Staphylococcus aureus*”, "MRSA",

"Resistência bacteriana", "Inibição da bomba de efluxo NorA", "Inibidor da NorA", "Resistência a antibióticos", "Modulação da resistência". Para controlar as palavras-chaves utilizadas na pesquisa, adotamos o método MeSH (Medical Subject Headings).

Com a intenção de ampliar a pesquisa de estudos sobre o tema, utilizamos grupos de palavras-chave combinadas com o método booleano conforme **quadro 1**.

PUBMED **Scielo** **SCOPUS**	**("Staphylococcus aureus" OR "bacterial resistance") AND ("NorA efflux pump") AND ("antibiotic resistance" OR "resistance modulation").**

Quadro 1. Busca de estudos
Fonte: Autor do estudo, 2024.

Critérios de inclusão e de exclusão

Para o presente estudo, foram selecionados os trabalhos científicos publicados no período de 2019 a 2024 (últimos cinco anos) que abordassem técnicas utilizadas para avaliar ativos inibidores da bomba de efluxo NorA *S. aureus*, ajudando a compreender melhor seu papel e potencial como alvo terapêutico. A seleção foi baseada na presença de palavras-chave relacionadas no título ou resumo dos textos completos disponíveis em português, inglês ou espanhol, disponíveis na integra, e que não fossem estudos inteiramente "in sílico". Estudos que não atenderam aos critérios de elegibilidade descritos foram excluídos da análise. Após a primeira triagem dos estudos, foram selecionados os estudos e discutidos na revisão da literatura, após uma leitura completa dos mesmos, conforme ilustrado na Figura 1.

Técnicas *In Vitro* para avaliação de potenciais Inibidores da Bomba de Efluxo *NorA* em *Staphylococcus aureus*

Para melhor organizar este estudo, ele foi dividido em tópicos os quais cada um destinado a discussão das metodologias *in vitro*.

Sendo assim, no estudo serão apresentados os testes de avaliação de potencias EPIS: avaliação da redução da concentração inibitória mínima (CIM), Avaliação da extrução de EtBr, Estimação de Atividade de extrução de EtBr em Ágar (Método Cartwheel), Checkerboard e Time-kill.

Cepas de Referência

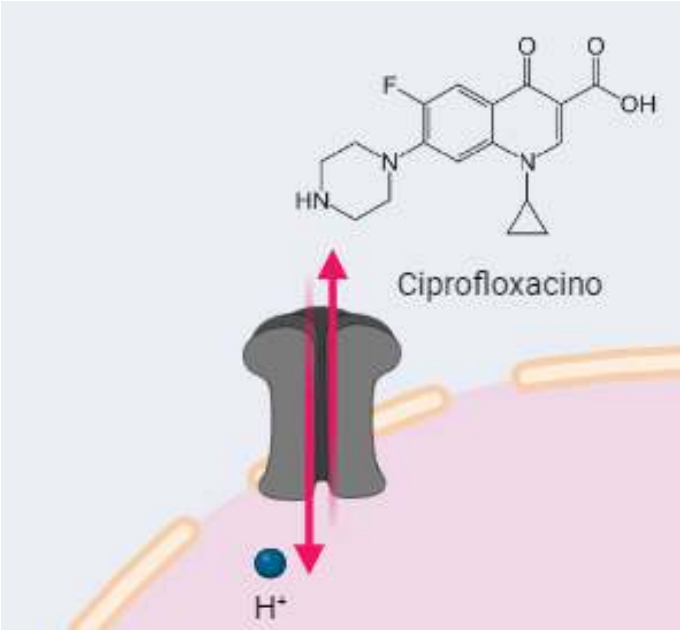
Para os ensaios, as cepas de S. aureus mais utilizadas foram, foram: SA-K1902 (com deleção do gene norA), SA-K2378 (complementada com um plasmídeo pCU 1 contendo a região promotora e codificadora de norA de SA1199B), SA-1199 (tipo selvagem) e SA-1199B (com superexpressão de norA e uma substituição A116E em GrlA).

Mecanismo de Efluxo NorA

Entre os transportadores de transmembrana, temos o transportador NorA, pertencente à família dos facilitadores maiores (FFM) do inglês *Major Facilitator Superfamily* (MFS), que é um dos sistemas de efluxo mais estudados em Staphylococcus aureus. Este transportador tem um peso molecular de 42,3 kDa, é constituído por 388 aminoácidos e possui 12 segmentos transmembranares (KUMAR; TUDU, 2023).

Sua estrutura é organizada em duas metades simétricas, o que facilita o movimento de fluoroquinolonas e outros substratos para fora da célula, acoplado ao movimento de prótons para dentro da célula, utilizando um gradiente de prótons (força motriz de prótons) para mediar o efluxo de fármacos e outras substâncias nocivas à célula (CHANDAL et al., 2023). A Figura 2 apresenta uma representação esquemática do mecanismo de resistência da NorA em S. aureus (CHANDAL et al., 2023).

Figura 2. Representação gráfica da bomba de efluxo NoraA



Fonte: Autor do estudo, 2024.

Como descrito, o transportador NorA é capaz de expelir diversos substratos estruturalmente distintos, incluindo fluoroquinolonas (como ciprofloxacina, norfloxacina e ofloxacina), biocidas (acriflavina, cetrimida) e agentes fluorescentes como o brometo de etídio, que é de grande importância em diversos ensaios de avaliação da BE NorA (KUMAR; TUDU, 2023).

Os inibidores de bombas de efluxo (EPIs) são considerados agentes terapêuticos promissores, pois, quando utilizados em conjunto com antimicrobianos, representam uma estratégia eficaz para controlar a atividade dessas bombas, podendo superar resistências bacterianas mediadas por NorA. Dessa forma, os fármacos voltariam a atingir as concentrações ótimas no interior da célula, restabelecendo sua função. Um exemplo disso é o caso de *S. aureus* resistente à norfloxacina (LEAL et al., 2021).

Avaliação da Inibição de Bomba de Efluxo através da Redução de CIM

O teste de redução da CIM pode ser útil para verificar o efeito sinérgico direto do produto EPI associado ao antimicrobiano ou à molécula antimicrobiana cuja CIM basal já é conhecida. Pereira da Cruz et al. (2020). realizaram o seguinte protocolo experimental para determinação da redução de CIM:

As cepas testes foram semeadas em meio sólido ágar Mueller-Hinton e mantidas em estufa a 37 °C por um período de 24 horas. Após isso, com a ajuda de uma alça, as colônias foram coletadas e inoculadas em tubos de ensaio contendo 3 mL de solução salina estéril (0,9%). Os inóculos foram ajustados a 0,5 na escala McFarland, equivalente a 10^5 UFC. Após a padronização, em microtubos Eppendorf® contendo 1350 µL do meio de cultura líquido BHI foram adicionados 150 µL do inóculo bacteriano.

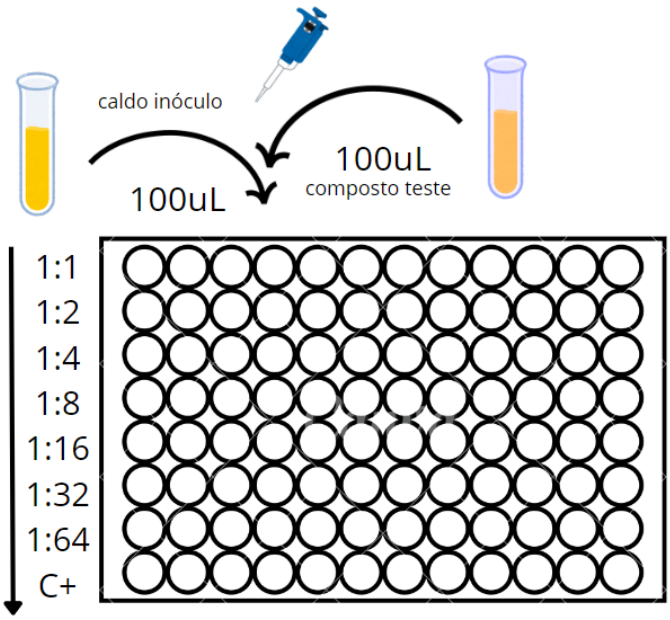
Em uma placa tipo ELISA de 96 poços, foram adicionados 100 µL da solução total proveniente dos Eppendorfs®. Em seguida, procedeu-se com a microdiluição: 100 µL de cada composto teste, dividido em grupos (associação do EPI + antimicrobiano, antimicrobiano isolado), foi adicionado ao primeiro poço, seguido de diluições seriadas (1:1) até o penúltimo

poço, sendo o último utilizado como controle de crescimento. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas.

Para a interpretação, podem ser utilizados dois métodos. Primeiramente, a olho nu, observando a turvação do caldo (turvação = crescimento, ausência = bloqueio de crescimento). Alternativamente, podem ser utilizados indicadores de atividade microbiana com resazurina, como descrito por Pereira da Cruz et al. (2020). No ensaio com resazurina, são adicionados 20 µL de resazurina sódica aos poços para a leitura, e após uma hora, observa-se qualquer mudança de cor nos poços, onde a transição de azul para rosa indica crescimento bacteriano.

A CIM é definida como a menor concentração na qual não foi observado crescimento bacteriano, seja por turvação ou mudança de cor, conforme os critérios do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) figura 3.

Figura 3. Representação gráfica da microdiluição seriada



Fonte: Autor do estudo, 2024.

Avaliação da ação de EPI através de extrução de EtBr

A atividade bloqueadora de efluxo em cepas de *S. aureus* SA-1199 e SA-1199B pode ser avaliada através da fluorescência emitida pela intercalação do EtBr no DNA bacteriano quando não eliminado pela bomba de efluxo NorA (Barbosa et al., 2021). Conforme descrito por Ahmad et al. (2021), o ensaio pode ser realizado em triplicata. O verapamil (VP) é um EPI conhecido e, portanto, utilizado como controle positivo da inibição de NorA. Felicetti et al. (2020) propõem como inibidor conhecido o carbonil cianeto 3-clorofenilhidrazona.

Segundo o protocolo descrito por Ahmad et al. (2021), para o ensaio, utilizar 100 µL de BHI contendo 1% de glicose, 10^6 UFC, e 0,5 x MIC do composto testado, dispensado em placas de microtitulação pretas. Incubar por 15 minutos a 37 °C com EtBr (10 µg/mL). O mesmo teste deve ser realizado utilizando um controle positivo, que nesse estudo foi o VP (25 mg/mL). A cinética da acumulação intracelular de EtBr foi medida com excitação a 490 nm e emissão a 579 nm após 15, 30 e 45 minutos. A média de três leituras foi registrada. A ligação de EtBr ao DNA de S. aureus estava relacionada ao aumento da intensidade de fluorescência

registrada pelo leitor, enquanto a expulsão de EtBr estava associada à diminuição da fluorescência ao longo do tempo.

J'Oliveira-Tintino et al. (2021) realizaram o ensaio com centrifugações após o tempo de incubação. As amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 3 minutos, e o pellet obtido foi ressuspendido em 3 mL de solução salina para ler a emissão de fluorescência. As amostras foram colocadas em uma cubeta de quartzo e excitadas a um comprimento de onda de 530 nm, com resolução espectral de 3 nm, incremento de 0,5 nm e uma taxa de varredura de 600 nm/min. A emissão foi monitorada de 400 a 800 nm, e o aumento de emissão de fluorescência foi associado à ação bloqueadora de efluxo.

O protocolo descrito por Thamilselvan et al. (2021) foi realizado com S. aureus SA-P2003 e SA-1199B, onde as colônias foram suspensas em tampão (50 mM NH4Cl, 110 mM NaCl, 52 mM Tris base, 7 mM KCl, 0,4 mM Na2HPO4 e 0,2% glicose) com pH ajustado para 7,5, até atingir uma densidade óptica medida a 600 nm de comprimento de onda de 0,2. As células foram tratadas com uma dose de 10 mg/mL de EtBr. Em seguida, as células foram centrifugadas a 12.000 rpm por 5 minutos e ressuspendidas em tampão PBS livre de EtBr com 0,4% de glicose, suplementado ou não com 5-NPPP (0,25 mg/mL). O VP (25 mg/mL) foi utilizado como controle positivo. O efluxo de EtBr das células foi observado em intervalos de 5 minutos durante 30 minutos, em triplicata. A intensidade da fluorescência foi medida com excitação a 530 nm e emissão a 600 nm, figura 4.

Figura 4. Mecanismo de emissão de fluorescência do EtBr no ensaio de extrução.



Fonte: Autor do estudo, 2024.

Felicetti et al. (2020) propõem os seguintes grupos: controle negativo consistindo em cepa + EtBr; controle positivo contendo cepa + EtBr + carbonil cianeto 3-clorofenilhidrazona (podendo ser usado o VP); grupo de teste contendo cepa + EtBr + composto a ser testado. Todas as substâncias na concentração MIC/8.

Estimação de Atividade em Ágar (Método Cartwheel)

A avaliação do efluxo de EtBr por S. aureus pode ser realizada em ágar sólido por meio da análise de fluorescência em ágar BHI com diferentes concentrações de EtBr, utilizando o método *cartwheel* de ágar com EtBr (EtBrCW). A técnica se baseia na capacidade das bactérias que apresentam NorA de eliminar o EtBr através do efluxo, consequentemente não produzindo fluorescência, enquanto a presença de fluorescência indica a inibição do efluxo mediado por NorA. Com o objetivo de avaliar especificamente a ação de NorA, pode-se utilizar uma cepa de referência SA-1199B, hiperexpressora de NorA cromossômico (AHMAD et al., 2021).

Conforme o protocolo descrito por Ahmad et al. (2021), foi utilizado ágar BHI+EtBr para o ensaio; para isso, os ágares devem ser recém-preparados ou no máximo do dia anterior, sendo acondicionados protegidos da luz. Para o ensaio, foram preparados ágares com diferentes concentrações de EtBr (0,0–2,5 mg/L). As placas com diferentes concentrações de

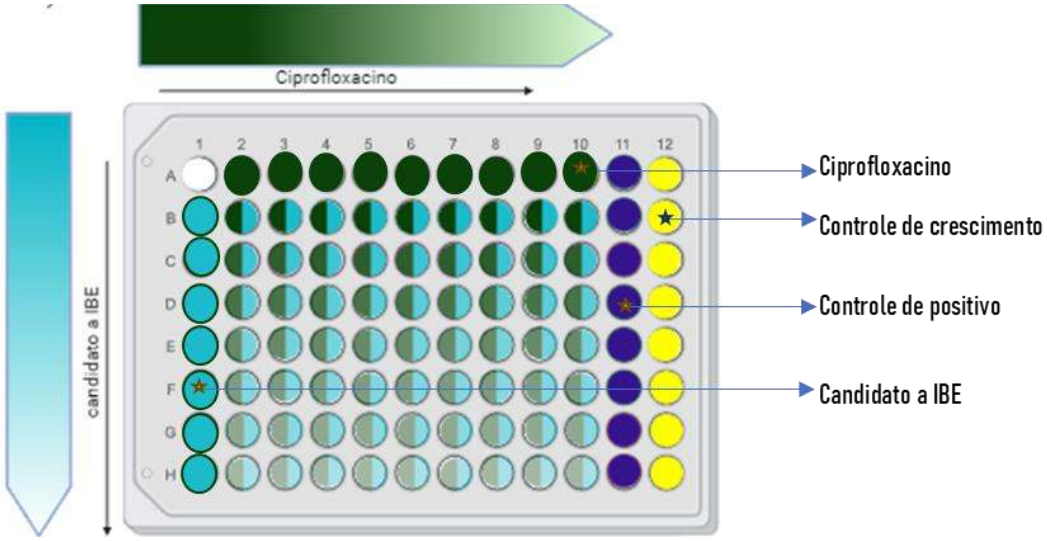
EtBr foram inoculadas com cepas recém-isoladas (10^7 UFC/mL) em um padrão de roda (oito isolados dispostos radialmente por placa conforme (Figura 3).

O inóculo teste foi preparado já com a adição da molécula a ser testada em uma concentração de 0,5 X MIC, preparado em caldo BHI *overnight* e ajustado a 0,5 do padrão de McFarland. No ensaio, foi adicionado um controle de inibição, preparado com um inibidor conhecido de NorA, VP (20 µg/mL), e um controle de indução de efluxo, cloreto de benzalcônio (1,0 mg/L) (Ahmad et al., 2021). As placas foram incubadas por 16 a 24 horas a 37 °C e, após a incubação, observadas sob um transiluminador UV, conforme Iamgem 1 (AHMAD et al., 2021).

Avaliação por ensaio de Checkerboard como ensaio de sinergismo

Com a intenção de avaliar o efeito sinérgico através do ensaio *checkerboard*, figura 5, é essencial realizar os testes com uma cepa hiperexpressora de NorA e uma cepa que não codifica a proteína. Nesse contexto, a cepa SA-K2378, uma cepa de S. aureus que superexpressa o gene norA devido à presença de um plasmídeo, pode ser utilizada como modelo para o teste. Simultaneamente, os ensaios sinérgicos devem ser realizados utilizando 12,5 µg/mL de EPIs e concentrações escalares de ciprofloxacino (CPX) contra a cepa SA-K1902, que não codifica o gene norA (FELICETTI et al., 2022).

Figura 5. Esquematização de placa de ensaio de Checkerboard..



Legenda: placa de ensaio de Checkerboard para ensaio de avaliação de sinergismo com ciprofloxacino.

Fonte: Autor do estudo, 2024.

Conforme descrito por Felicetti et al. (2022), para o ensaio foram adotadas concentrações dobradas dos compostos, sendo o CPX uma fluoroquinolona amplamente utilizada mundialmente. Cada molécula foi testada na faixa de concentração de 12,5 – 0,2 µg/mL, enquanto o CPX foi usado em concentrações escalares (dobrando) a partir do valor da MIC de cada S. aureus. A associação de composto/antimicrobiano foi considerada sinérgica quando produzia uma redução ≥4 vezes no valor da MIC de CPX.

Rampacci et al. (2023) recomendam utilizar concentrações escalonadas com diluições em série de cada composto, de MIC/4 a MIC/128, para evitar qualquer efeito sinérgico devido à atividade antibacteriana intrínseca do EPI suposto testado.

No protocolo apresentado, a preparação do inóculo foi realizada em caldo Mueller-Hinton (CMH) por suspensão de colônias a partir de culturas de 24 horas em ágar Mueller-Hinton cationicamente ajustado. Nesse ensaio, 100 µL da suspensão bacteriana foram inoculados em cada poço a uma concentração final de 5×10^4 UFCs. As placas foram incubadas aerobicamente a 37 °C por 20 horas. Após a leitura da turbidez óptica dos poços, o Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) foi calculado para a interpretação da sinergia conforme figura 6.

Figura 6. Cálculo do ICIF para a avaliação da sinergia entre drogas e Inibidores de Efluxo (EPI).

$$\text{ICIF} = \frac{\text{MIC da combinação de drogas}}{\text{MIC da droga sozinha}} + \frac{\text{MIC da combinação de EPI}}{\text{MIC do EPI sozinho}}$$

Legenda: O ICIF é calculado como a soma das razões entre a MIC da combinação e a MIC da droga sozinha, e a MIC da combinação e a MIC do EPI sozinho. Fonte: adaptado de Rampacci et al.,2023.

O Fator de Modulação (MF) representa a redução n-vezes do MIC do antimicrobiano correspondente quando combinado com o EPI. A combinação foi considerada sinérgica quando o Índice de Concentração Inibitória Fracionada (FICI) foi ≤0,5.

Ensaio de Time-Kill como ensaio de sinergismo

O ensaio realizado por Chandal et al. (2023) utilizou S. aureus SA-1199B, cultivado até atingir a fase exponencial intermediária, a partir da qual foi preparada uma suspensão com OD600nm ~0,3. O inóculo inicial de S. aureus SA-1199B foi exposto à ciprofloxacina nas concentrações de 8 e 2 µg/mL, separadamente. Além disso, o composto teste EPI foi avaliado em sua concentração sub-inibitória de 32 µg/mL, tanto na presença quanto na ausência de ciprofloxacina a 2 µg/mL. O cultivo foi avaliado em diferentes intervalos de tempo (0, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 horas) para determinar a contagem bacteriana em meio sólido, que foi expressa como UFC/mL. O ponto de corte para efeito sinérgico foi adotado como uma redução mínima de 2 log de UFC/mL no tempo de morte, em comparação ao controle realizado apenas com ciprofloxacina.

O protocolo descrito por Felicetti et al. (2022) utilizou o ativo a ser testado a uma concentração de 6,25 µg/mL, combinado com três diferentes concentrações de ciprofloxacina (CPX) (MIC, ½ MIC e ¼ MIC), para investigar sua capacidade de potencializar a atividade bactericida do CPX (Fig. 4) (FELICETTI et al., 2022).As análises de células viáveis foram realizadas por diluição seriada e em caldo após 0, 2, 4, 6, 8 e 24 horas de incubação a 37°C, tanto na presença quanto na ausência de CPX e/ou EPIs. Após a incubação, as amostras foram plaqueadas em ágar sólido, e o número de UFC/mL foi avaliado após 24 horas de incubação a 37°C (FELICETTI et al., 2022).

O objetivo do ensaio é observar uma diminuição de 3 log CFU/mL nas contagens bacterianas em comparação com as contagens do controle de crescimento, e 2 log CFU/mL em comparação com as contagens do controle de tempo de morte com CPX, dessa forma revelando um efeito de redução do tempo de morte (FELICETTI et al., 2022).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A avaliação in vitro de potenciais inibidores da bomba de efluxo NorA em *Staphylococcus aureus* é uma área de pesquisa crucial, considerando o papel significativo desse mecanismo na resistência bacteriana a antimicrobianos. A combinação de antimicrobianos com inibidores da bomba de efluxo, como os EPIs, pode aumentar a eficácia dos tratamentos antimicrobianos, resensibilizando cepas patogênicas resistentes.

O conjunto de técnicas para avaliação da atividade de potenciais EPIs é fundamental para elucidar sua eficácia como inibidores da NorA, sendo necessário o uso de uma cepa de teste específica, como o S. aureus ATCC 1199B. Técnicas in vitro já estabelecidas na literatura são a melhor forma de esclarecer esse tipo de ação, como demonstrado neste estudo.

Contudo, apenas a avaliação da ação como EPI não é suficiente para a aplicação clínica, sendo necessários testes complementares, como ensaios de citotoxicidade, para o seguimento dos estudos com moléculas promissoras.

REFERENCIAS

AHMAD, Adel Attia M. et al. Thymoquinone'potent impairment of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump activity. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 16483, 2024. Disponível em: https://www.nature.com/articles/s41598-024-23456-7.

BIALVAEI, Abed Zahedi et al. Current methods for the identification of carbapenemases. **Journal of Chemotherapy**, v. 28, n. 1, p. 1-19, 2016. Disponível em: https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1179/1973947815Y.0000000029.

CHANDAL, Nishtha et al. Efflux pump inhibitory potential of indole derivatives as an arsenal against norA over-expressing *Staphylococcus aureus*. **Microbiology Spectrum**, v. 11, n. 5, p. e04876-22, 2023. Disponível em: https://journals.asm.org/doi/10.1128/spectrum.04876-22.

DE MORAIS OLIVEIRA-TINTINO, Cícera Datiane et al. The 1, 8-naphthyridines sulfonamides are NorA efflux pump inhibitors. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 24, p. 233-240, 2021. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213716521000252.

FELICETTI, Tommaso et al. New C-6 functionalized quinoline NorA inhibitors strongly synergize with ciprofloxacin against planktonic and biofilm growing resistant *Staphylococcus aureus* strains. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 241, p. 114656, 2022. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523422007051.

FERRI, Maurizio et al. Antimicrobial resistance: A global emerging threat to public health systems. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 13, p. 2857-2876, 2017. Disponível em: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408398.2015.1077192.

KUMAR, Gautam; TUDU, Asha Kiran. Tackling multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* by natural products and their analogues acting as NorA efflux pump inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 80, p. 117187, 2023. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089623005634.

LEAL, Antonio Linkoln Alves Borges et al. Potentiating activity of Norfloxacin by synthetic chalcones against NorA overproducing *Staphylococcus aureus*. **Microbial Pathogenesis**, v. 155, p. 104894, 2021. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401021000915.

LOBANOVSKA, Mariya; PILLA, Giulia. Focus: drug development: Penicillin's discovery and antibiotic resistance: lessons for the future?. **The Yale Journal of Biology and**

Medicine, v. 90, n. 1, p. 135, 2017. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5394671/.

MEDINA, Eva; PIEPER, Dietmar Helmut. Tackling threats and future problems of multidrug-resistant bacteria. How to overcome the antibiotic crisis: facts, challenges, technologies and future perspectives, p. 3-33, 2016. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-48098-1_1.

Ministério da Saúde. DIRETRIZES METODOLÓGICAS PARA ELABORAÇÃO DE DIRETRIZES CLÍNICAS. 2ª ed. Editora, 2020. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes_metodologicas_clinicas.pdf.

MUNIZ, Débora Feitosa et al. In vitro and in silico inhibitory effects of synthetic and natural eugenol derivatives against the NorA efflux pump in *Staphylococcus aureus*. **Food Chemistry**, v. 337, p. 127776, 2021. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814620314991.

OLIVEIRA-TINTINO, C. D. M. et al. The 1, 8-naphthyridines sulfonamides are NorA efflux pump inhibitors. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, 2021; 24: 233–40. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213716521000252.

PEREIRA DA CRUZ, Rafael et al. Effect of α-bisabolol and its β-cyclodextrin complex as TetK and NorA efflux pump inhibitors in *Staphylococcus aureus* strains. **Antibiotics**, v. 9, n. 1, p. 28, 2020. Disponível em: https://www.mdpi.com/2079-6382/9/1/28.

RAMPACCI, Elisa et al. Inhibition of *Staphylococcus pseudintermedius* Efflux Pumps by Using *Staphylococcus aureus* NorA Efflux Pump Inhibitors. **Antibiotics**, v. 12, n. 5, p. 806, 2023. Disponível em: https://www.mdpi.com/2079-6382/12/5/806.

SOWOLE, Luciana; MING, Damien K.; DAVIES, Frances. Multidrug-resistant bacteria. **British Journal of Hospital Medicine**, v. 79, n. 5, p. C66-C69, 2018. Disponível em: https://www.magonlinelibrary.com/doi/full/10.12968/hmed.2018.79.5.C66.

THAMILSELVAN, Gopalakrishnan et al. Development of an antibiotic resistance breaker to resensitize drug-resistant *Staphylococcus aureus*: In silico and in vitro approach. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 700198, 2021. Disponível em: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2021.700198/full.

UBUKATA, K.; ITOH-YAMASHITA, N.; KONNO, M. Cloning and expression of the *norA* gene for fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 33, n. 9, p. 1535-1539, 1989. Disponível em: https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/AAC.33.9.1535.