

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
CURSO CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Ana Bárbara Polo**

**“Estratégias de pesquisa para identificação do mecanismo de ação de  
antimicrobianos”**

Juiz de Fora  
2021

**Ana Bárbara Polo**

**“Estratégias de pesquisa para identificação do mecanismo de ação de antimicrobianos”**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dra. Ana Carolina Morais Apolônio

Juiz de Fora

2021

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Polo, Ana Bárbara.

Estratégias de pesquisa para identificação do mecanismo de ação de antimicrobianos / Ana Bárbara Polo. -- 2021.

48 f.

Orientadora: Ana Carolina Morais Apolônio

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas, 2021.

1. Compostos antimicrobianos. 2. Mecanismo de ação. 3. Descoberta de medicamentos. I. Morais Apolônio, Ana Carolina, orient. II. Título.

**Ana Bárbara Polo**

**“Estratégias de pesquisa para identificação do mecanismo de ação de antimicrobianos”**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada em 19 de março de 2021

BANCA EXAMINADORA

--

---

Prof<sup>a</sup> Dra. Ana Carolina Morais Apolônio - Orientador  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof. Dr. Rodrigo Luiz Fabri  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Mestre Ari Sérgio de Oliveira Lemos  
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dedico este trabalho a toda minha família que me ajudou em toda a trajetória da graduação.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a minha família, que possibilitou o meu estudo em uma cidade que não era a minha natal e sempre me apoiou em todas as minhas escolhas. Agradeço também a minha orientadora, Prof. Dr<sup>a</sup> Ana Carolina Moraes Apolônio, por todos os ensinamentos, cobrança e acolhimento, que sem dúvidas, foram fatores chave para eu vir a ser uma profissional melhor e mais competente. Agradeço também aos membros avaliadores da minha banca, Prof. Dr. Rodrigo Luiz Fabri, pelo acolhimento, e ao Ari Sérgio Oliveira Lemos, também pelos ensinamentos, conversas de apoio, risadas e perrengues passados juntos. Por fim, gostaria de agradecer as meninas do laboratório, em especial a Mariana Massi Afonso Alvim e a Lívia de Oliveira Rodrigues, pela construção de uma amizade sincera e duradoura.

“Um cientista em seu laboratório não é um mero técnico: é também uma criança que enfrenta fenômenos naturais que o impressionam como se fossem contos de fada.”

**Marie Curie**

## RESUMO

Apesar de bactérias poderem desenvolver resistência antimicrobiana de forma natural, a resistência aos antibióticos se tornou uma crise, nos levando a buscar cada vez mais alternativas antimicrobianas para a prática médica e terapêutica. Frente a essa cruel realidade, o presente trabalho buscou apresentar uma revisão de métodos laboratoriais de fácil aplicabilidade e que avaliam o modo de ação de diferentes tipos de compostos. Esse é um pré-requisito para o desenvolvimento e descoberta de novos fármacos, contribuindo, então, na busca de novos agentes antimicrobianos. Foi feita uma triagem na literatura pela busca das palavras-chave “antibiótico”, “modo de ação”, “atividade antimicrobiana”, “método”, “bactérias” e “modo de inibição” nas bases de dados Pubmed, Scopus, BVS e Science Direct, com trabalhos publicados entre 2000 e 2019. Esta revisão procurou demonstrar a vasta gama de métodos utilizados na pesquisa de mecanismos de ação de substâncias antibacterianas, além de trazer os protocolos de experimentos disponíveis na literatura relacionados às técnicas abordadas. A pesquisa e descoberta de novos medicamentos traz um otimismo para novas alternativas de terapêutica no futuro. Espera-se com essa revisão possibilitar um início dos experimentos de forma mais prática e rápida.

Palavras-chave: resistência bacteriana; modo de ação; desenvolvimento de fármacos; métodos laboratoriais.



## ABSTRACT

Although bacteria can naturally develop antimicrobial resistance, antibiotic resistance has become a crisis, leading us to seek more and more antimicrobial alternatives for medical practice and therapy. In the face of this cruel reality, the present work sought to present a review of laboratory methods that are easily applicable and that evaluate the mode of action of different types of compounds, since this is a prerequisite for the development and discovery of new drugs, contributing, then, in the search for new antimicrobial agents. The literature was screened using the keywords "antibiotic", "mode of action", "antimicrobial activity", "method", "bacteria" and "mode of inhibition" in the databases Pubmed, Scopus, BVS and Science Direct, with works published between 2000 and 2019. This review sought to demonstrate the wide range of methods used in the search for mechanisms of action of antibacterial substances, in addition to bringing the experimental protocols available in the literature related to the techniques covered. The research and discovery of new drugs brings optimism towards new therapeutic alternatives in the future. This review is expected to make it possible to start the experiments in a more practical and quick way.

Keywords: bacterial resistance; mode of action; drug development; laboratory methods.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>13</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>14</b>
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>24</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>25</b>
	<b>ANEXO A – PROTOCOLOS.....</b>	<b>30</b>
	<b>ANEXO B – IMAGEM ARTIGO PUBLICADO.....</b>	<b>48</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana aos antibióticos é um problema muito conhecido e falado atualmente, porém nem sempre foi assim. É importante lembrar que na era pré-antibiótica, a maioria das mortes era devido a doenças infecciosas, culminando em uma baixa expectativa de vida (JAYACHANDRAN, 2018). Com o tempo, a ciência evoluiu e os antibióticos foram descobertos, com seu marco inicial na descoberta da penicilina em 1928 por Alexander Fleming (SENGUPTA *et al*, 2013), transformando a medicina de forma abrupta e salvando milhares de vidas. A prescrição da penicilina começou na década de 1940 (MICHIELS *et al*, 2016), porém logo em 1947, foi encontrada a primeira bactéria resistente à penicilina, *Staphylococcus aureus*, que logo se tornou bastante resistente ao novo antibiótico, inviabilizando o uso da penicilina para o tratamento dessas infecções (CDC, 2013).

O desenvolvimento de resistência antimicrobiana por bactérias acontece de forma natural, mas também de forma adquirida, sendo esta de forma muito acelerada por razões como a má prescrição, o mau uso e excessivo de antimicrobianos, regulamentação inexistente ou inadequada para prevenção, o uso agrícola extensivo, barreiras regulatórias e pela disponibilidade de poucos novos antibióticos (VENTOLA, 2015). A Organização Mundial da Saúde (OMS) (OMS, 2017a) e o Centro de Controle de Doenças (CDC, 2013) já alertaram que “o mundo está ficando sem antibióticos”, com a apresentação de um relatório que confirma que existe uma lacuna na produção de novos antimicrobianos. Os poucos medicamentos que se encontram em desenvolvimento clínico são modificações de classes já existentes de antibióticos e, quando se leva em consideração as inúmeras infecções resistentes aos antimicrobianos. Esses medicamentos se tornam apenas soluções de curto prazo. A OMS, considerando essa realidade e determinada em ajudar a combater a resistência crescente aos medicamentos antimicrobianos, publicou uma lista de 12 patógenos prioritários globais, sendo eles *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, *Shigella* spp, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter* spp, espécies de *Salmonellae* e *Enterobacteriaceae*. Essa lista objetivou a promoção da pesquisa, do desenvolvimento e a orientação para a descoberta de novos antibióticos no tratamento de bactérias resistentes (OMS 2017b).

Depois da década de 1980, essa área de pesquisa tornou-se menos interessante para as empresas farmacêuticas, considerando os altos custos associados a essa pesquisa com o retorno do investimento, quando comparado com outras classes de medicamentos como para as doenças crônicas (GRAJADÁCS, 2019; THEURETZBACHER *et al*, 2020). Assim, a ação da OMS foi por causa do baixo esforço por parte dessas empresas no desenvolvimento de novos antibióticos. Somando-se a escassez de pesquisa nessa área, o vocabulário para resistência bacteriana é diverso: bactérias multirresistentes (MDR), extensivamente resistentes a drogas (XDR) e pan-resistentes a drogas (PDR). E isso considerando somente as formas planctônicas, porém deve-se prestar atenção em outras formas, como as células bacterianas metabolicamente inativas que não crescem ou morrem se expostas a concentrações bactericidas de antibióticos, e também os biofilmes, que são considerados como uma forma de sobrevivência para adaptação a um ambiente hostil (GRAJADÁCS, 2019). Além dessas condições, também é preciso analisar a morfologia celular distinta que existem entre as bactérias, como as Gram-negativas, Gram-positivas e atípicas, que pode ser um obstáculo para a ação antibacteriana e entendimento do modo de ação (Referência).

A busca por novos antimicrobianos torna-se então essencial, devido ao aumento exacerbado de casos bacterianos resistentes (SRINIVASAN *et al*, 2019), com vários pesquisadores empenhados nessa busca. Existem alguns compostos promissores, como os derivados sintéticos (DHARA *et al*, 2017), extratos de plantas (PINTO *et al*, 2017), análogos de bacteriocinas (KOOPMANS *et al*, 2015), análogos de antimicrobianos já conhecidos (YARLAGADDA *et al*, 2015), entre outros. Uma vez estabelecida a atividade antibacteriana de um composto, vários métodos laboratoriais podem ser aplicados na avaliação e identificação do mecanismo de ação desses antimicrobianos. Portanto, esta revisão tem o objetivo de apresentar uma diversidade desses métodos que podem ser utilizados na avaliação e detecção do modo de ação dos compostos antimicrobianos.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Para esta revisão, o método utilizado foi uma revisão na literatura existente de estudos laboratoriais que examinassem o modo de ação de diferentes compostos antibacterianos.

Os estudos foram identificados pelas palavras-chave “modo de ação”, “antibiótico”, “atividade antimicrobiana”, “modo de inibição”, “método” e “bactérias” nas seguintes bases de dados: *Pubmed*, *Scopus*, *Science Direct* e na plataforma BVS. Os trabalhos selecionados estavam compreendidos no período de tempo de 2000 a 2019.

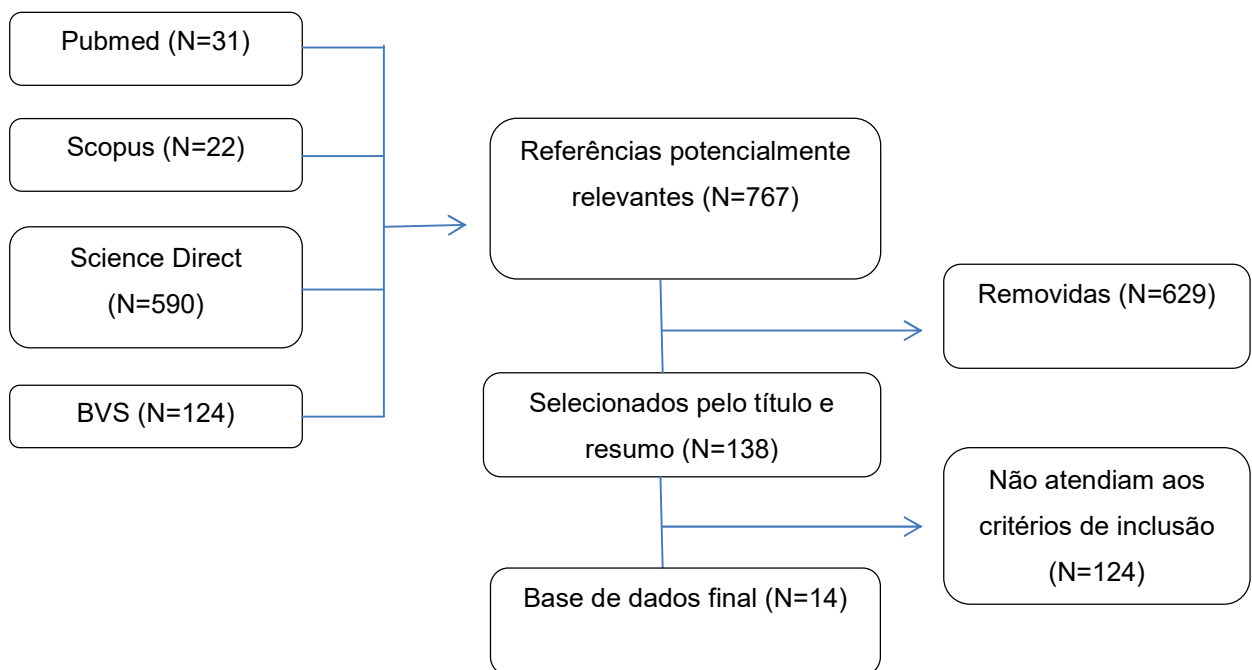
Os critérios de inclusão aplicados consistiram na existência das palavras-chave “modo de ação” no título do artigo ou no resumo, necessitando também o trabalho apresentar métodos bem documentados e detalhados. Cada artigo da presente revisão foi organizado de forma que apresentasse um método diferente de um outro e que tivesse como alvo antimicrobianos contra patógenos humanos.

### 3 RESULTADOS

Com base nos critérios de pesquisa que foram apresentados na seção “Material e métodos”, uma variedade de artigos foi recuperada. Entretanto, trabalhando com sequências de busca pré-determinadas, junto com os critérios de inclusão descritos previamente, foi selecionada uma determinada quantidade de artigos.

Um fluxo diagrama que mostra esse processo de recuperação dos estudos selecionados para esta revisão estão contidos na Figura 1. E focando na busca por protocolos de testes de mecanismo de ação, a Tabela 1 foi elaborada mostrando as principais informações apresentadas nos trabalhos selecionados, sendo um número total de 14. Além disso, os protocolos dos testes serão expostos no anexo do presente trabalho.

Figura 1: Artigos incluídos para a revisão



Fonte: Polo, A. B., FABRI, R. L., APOLÔNIO, A. C. M., 2020.

Tabela 1: Principais informações dos trabalhos selecionados.

Referência	Tipo de substância	Microrganismo	Técnica empregada	Modo de ação
Muthaiyan, Arunachalam et al 2007	Daptomicina	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	Perfil transcricional	Despolarização da membrana e inibição da parede celular
Signoretto, Caterina et al 2013	Cogumelho shitake e chicória vermelha	<i>Streptococcus mutans</i> UA159	Análise proteômica; avaliação da síntese de RNA, DNA e proteínas; MEV	Inibição da síntese macromolecular específica e alteração morfológica
Siriyong, Thanyauck et al 2017	Conessina	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Teste com H33342; ensaio da captação de NPN	Inibidor da bomba de efluxo
Liu, Y et al 2009	Nanopartículas de ZnO	<i>Escherichia coli</i>	MEV; MET; Espectroscopia Raman	Desorganização da membrana e destruição de componentes celulares
Xiao Zhu-Ping 2014	Híbridos de flavonoides e fluoroquinolonas	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633, <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 e <i>Candida albicans</i> ATCC 90873	Testes de fluorescência; teste enzimático (com DNA girase); docking molecular	Inibidor da bomba de efluxo e da DNA girase
Tekeli Iener 2014	<i>Salvia verticillata</i> L.	<i>Listeria innocua</i> e <i>Escherichia coli</i>	Teste de PI e SYTO 13 e análise por citometria de fluxo	Permeabilização da membrana
Andrea Chan 2013	Allil isotiocianato (TIA) and cinnamaldeído (CNAD) – óleos essenciais de plantas	Biossensores bacterianos de <i>Escherichia coli</i> e <i>Acinetobacter baylyi</i>	Biossensores bacterianos; Perfil transcricional	Diminuição na integridade da membrana e da atividade celular
Hayat Sumreen 2018	Nanopartículas de MgO	<i>Escherichia coli</i> KT273995, <i>Staphylococcus aureus</i> KT250728 e <i>Klebsiella pneumoniae</i> KT273996	Teste de Bradford	Disrupção na membrana
Hee soo Park et al 2007	Inibidor FabI CG400549	<i>Staphylococcus aureus</i> (de espécimes clínicos humanos)	Formação de plasmídeo recombinante para monitoramento da expressão de gene, seguido por Western Blot	Inibidor de FabI (enzima chave na síntese de ácidos graxos)
Angela inacio et al 2015	SQA (surfactantes quaternários de amônio)	<i>Escherichia coli</i>	Testes de fluorescência (kit Live/Dead® BacLight™); teste com EdU; avaliação do conteúdo de DNA e ciclo celular; avaliação do potencial de membrana; quantificação intracelular de ATP, ADP e AMP; medida de oxigênio	Comprometimento da atividade celular, divisão sem dissolução da membrana, com permeabilização da membrana ou complete dissolução dependendo da concentração
Arias, Mauricio et al 2015	Análogos de peptídeos Tritripticina	<i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> e lipossomos de vesículas grandes multilamelares e unilamelares	Fluorescência do triptofano e extinção da acrilamida; espectroscopia de difração circular; scanning de calorimetria diferencial; vazamento da calceína; teste de mobilidade do DNA; testes de inibição de DNA e RNA	Permeabilização da membrana e inibição da síntese de DNA e RNA
Data, Aritreyee et	Peptídeo VG16KRRP	<i>Cryptococcus neoformans</i>	MEV; espectroscopia de fluorescência e de difração circular; potencial zeta;	Permeabilização da membrana e inibição da

al 2016			teste com NPN e PI; vazamento da calceína; análise transcricional; microscopia de laser confocal; citometria de fluxo; docking molecular	transcrição de proteínas e DNA
Carvalho, L A C et al 2015	Peptídeo <i>Hb40-61a</i>	<i>Candida albicans</i> , <i>Candida krusei</i> e <i>Candida parapsilosis</i>	Teste com SYTO 9; microscopia de varredura de laser confocal; análises de fluorescência	Permeabilização e despolarização da membrana
Kora, Aruna Jyothi e Sashidhar R B 2018	Nanopartículas de prata sintetizadas da goma kondagogu	<i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	Vazamento de conteúdos citoplasmáticos; teste com NPN; efeito do antioxidante NAC e detecção de EROs com H2DCFDA; MEV	Permeabilização da membrana e indução de EROs

Fonte: Polo, A. B., FABRI, R. L., APOLÔNIO, A. C. M., 2020.



## 4 DISCUSSÃO

O requisito básico para o desenvolvimento e descoberta de novos medicamentos é a compreensão do modo de ação dos compostos que apresentam alguma atividade biológica (GUIDO *et al*, 2010), sendo que um dos principais motivos para a realização desses estudos é que o alvo molecular desses compostos precisa ser bem identificados para que não ocorram efeitos colaterais drásticos em células eucarióticas. Dessa forma, a comprovação de que a interação com o alvo celular é a causa direta da morte ou inativação do microrganismo é necessária (BANDOW *et al*, 2003). Alguns alvos são mais comumente estudados na pesquisa do modo de ação, sendo eles a interferência na replicação do DNA, na síntese de peptidoglicano da parede celular e na alteração da membrana citoplasmática microbiana, que pode levar ao aumento da permeabilidade, à despolarização ou à destruição completa (SRINIVASAN *et al*, 2019).

Esta revisão bibliográfica objetiva apresentar determinadas técnicas empregadas na pesquisa do modo de ação de diferentes substâncias antimicrobianas, sendo que todos os detalhes dos protocolos estarão disponibilizados no anexo deste trabalho.

Quando se investiga a forma como uma substância pode atuar no DNA de microrganismos, um composto denominado 5-etinil-2-desoxiuridina (EdU), um análogo da timidina que se incorpora ao DNA, pode ser utilizado para avaliação da síntese de DNA (CHEHREHASA *et al*, 2009), no qual colônias de microrganismos que estão expostas a um fármaco a uma determinada concentração passam por esse ensaio de proliferação celular utilizando o EdU. Ensaio de proliferação celular podem indicar importantes informações no que diz respeito à homeostase celular, à genotoxicidade e a eficácia de compostos, sendo que a vantagem do EdU em relação a outros métodos é a não utilização de marcadores radioativos ou de anticorpos para detecção do desoxirribonucleosídeo incorporado (VOYTENA, 2017). A utilização deste composto somado ao emprego da técnica de citometria de fluxo permite um ensaio quantitativo para a replicação do DNA e também permite a visualização do DNA por microscopia de fluorescência (INÁCIO *et al*, 2016), tendo em mente que células afetadas pela droga apresentam inibição na síntese de DNA. A técnica de citometria de fluxo envolve a medição da dispersão e fluorescência do feixe de laser refletido por meio de um feixe de laser incidente na amostra celular

(BRAGA *et al*, 2016). Essa técnica possui uma maior eficácia utilizando em testes de atividade antimicrobiana do que por meio de métodos tradicionais, como disco difusão e microdiluição, já que gera uma maior quantidade de dados (TEKELI *et al*, 2014).

O conhecimento e as técnicas de estudo de DNA também podem ser aplicados em bactérias com plasmídeos recombinantes (KRAEMER e LANDOLO, 1990). Esses experimentos consistem na amplificação do gene supostamente afetado pela droga, seguida da clonagem deste em um vetor já conhecido, mais fácil de ser estudado e manipulado, produzindo seu respectivo plasmídeo recombinante. A cepa com esse novo plasmídeo é submetida aos mesmos testes de suscetibilidade a drogas e os níveis de expressão gênica podem ser examinados por meio da técnica de Western Blot (PARK *et al*, 2007), sendo possível a análise quantitativa de proteínas em uma determinada amostra.

O uso de peptídeos antimicrobianos (PAMs), principalmente seus análogos peptídicos, tem sido objeto de estudo de muitos grupos de pesquisadores, com o surgimento de microrganismos multirresistentes (ARIAS *et al*, 2015). Apesar das atividades dos PAMs estarem mais intimamente relacionados com danos de membrana, o DNA também pode ser alvo dessas substâncias (EPAND e VOGEL, 1999). Para avaliação da atividade de PAMs em DNA, um teste relativamente rápido e fácil que é constantemente utilizado em laboratórios é o teste de ensaio de mobilidade do DNA através de eletroforese em gel de agarose (YUNG-SHARP e KUMAR, 1989), uma vez que a ligação do complexo DNA-PAMs aumenta o tamanho da molécula de DNA, impedindo ou afetando sua mobilidade no gel de agarose (ARIAS *et al*, 2015). Outro teste que analisa o resultado dessa interação é a espectroscopia de dicroísmo circular (DC) (DATTA *et al*, 2016), onde as estruturas proteicas secundárias interagem em particular com a luz polarizada, fornecendo informações sobre a mudança conformacional da proteína, podendo então estabelecer a correlação com o ambiente hostil de uma droga (MILES e WALLACE, 2016).

Uma maneira de identificação rápida, não invasiva e extremamente sensível de microrganismos, que pode ser utilizada em protocolos de testes de investigação de modo de ação, fornecendo informações sobre a estrutura de moléculas, como proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e carboidratos é o uso de espectroscopia Raman (ASHTON *et al*, 2011; HUANG *et al*, 2010). A espectroscopia Raman fornece um

espectro que, por meio do qual, podem ser monitoradas alterações fenotípicas que decorrem de um estresse ambiental (como o uso de drogas antimicrobianas) (HUANG *et al*, 2010). O método basicamente consiste na interação da luz com as moléculas, a fim de medir as vibrações de grupos funcionais, sendo que conforme a luz vai interagindo com as moléculas, uma mudança nos estados de energia é induzida, deixando a molécula em um estado excitado, que resulta na perda de energia do fóton e na mudança da cor de luz incidente devido ao desvio de frequência, medindo-se então o valor desse desvio (ASHTON *et al*, 2011). Entretanto, mesmo com os benefícios esclarecidos anteriormente, a utilização dessa técnica ainda é pouco difundida, devido ao seu alto custo.

Além da utilização da espectroscopia Raman para traçar o perfil metabólico de uma resposta microbiana aos antibióticos, a chamada “era da ômica” trouxe a área da metabolômica, na qual as investigações do modo de ação de substâncias antimicrobianas se concentram no estudo de mudanças no metabolismo intracelular em resposta aos compostos antimicrobianos. Os metabólitos são os produtos finais dos processos celulares e seus níveis podem esclarecer os efeitos ambientais sobre as células bacterianas (BELINATO *et al*, 2019). Este método consiste no emprego de abordagens metabólicas da metabolômica antes e depois do tratamento com antibióticos, podendo fornecer informações sobre o modo de ação de antibióticos que afetam processos intracelulares ou extracelulares, no caso de antibióticos que inibem a síntese de parede celular (HOERR *et al*, 2016). Porém, a desvantagem associada ao seu emprego é a alta complexidade dos metabólitos bacterianos, que ainda são pouco explorados e podem ser de difícil identificação (BELINATO *et al*, 2019).

No que diz respeito ao dano em membranas celulares, o uso de marcadores fluorescentes é amplamente empregado nos testes de modo de ação para antimicrobianos que alteram essa estrutura, sendo um desses testes o “ensaio de captação de NPN”. O NPN (1-N-fenilnaftilamina) é uma sonda capaz de produzir fluorescência em ambientes não polares, como em membranas celulares (SIRIYONG *et al*, 2017). Este composto normalmente não atravessa a membrana por causa da sua característica hidrofóbica, sendo bloqueado pela membrana externa intacta da célula bacteriana (HELANDER e MATTILA-SANDHOLM, 2000). Entretanto, basta essa membrana ser danificada, para que o composto possa penetrar e então o nível dessa permeabilidade, baseada na intensidade da

fluorescência mediada por um espectrofluorômetro (HELANDER e MATTILA-SANDHOLM, 2000; THOMAS e MATTHIAS, 1996).

Também é possível o emprego de outras substâncias para avaliação de integridade de membrana, como iodeto de propídio (PI) e SYTO 9, podendo ser avaliadas tanto em membranas celulares de bactérias, como de fungos. Quando as células estão danificadas, essas substâncias se intercalam com a fita dupla de DNA e se tornam fluorescentes (TEKELI *et al*, 2014). O funcionamento desses testes, utilizando como exemplo a combinação de SYTO 9 e PI, se baseia na seguinte forma: o SYTO 9, cuja coloração é verde fluorescente, consegue penetrar em todos os tipos de células, intactas ou danificadas. Porém, quando se adiciona o PI, cuja coloração é vermelha e só penetra em células danificadas, ele faz com que toda a fluorescência de SYTO 9 se extinga em células danificadas. O resultado desse teste é avaliado por meio de microscopia de fluorescência e é um indicador valioso da permeabilidade de membrana por substâncias antimicrobianas (CARVALHO *et al*, 2015).

A permeabilidade das membranas celulares também pode ser avaliada por meio do teste de vazamento do corante calceína, sendo realizado comumente em modelos de membrana ou vesículas contendo esse corante para pôster incubação em tampão Tris e avaliação por espectroscopia de fluorescência (CARVALHO *et al*, 2015). O corante calceína tem afinidade pelo cálcio nas membranas, e um aumento muito grande no acúmulo de cálcio indica uma maior permeabilidade da membrana. A avaliação deve ser feita antes da adição do fármaco analisado e depois, para que o cálculo da porcentagem de vazamento do corante seja feito (ARIAS *et al*, 2015).

Além do teste de vazamento da calceína, testes de vazamento de proteínas podem ser utilizados para avaliar a extensão de danos de membranas. O método de Bradford é um desses testes, em que se utiliza um corante ácido em amostras diluídas e que ao interagir com proteínas, torna-se azul (BRADFORD, 1976). Após esse procedimento, a absorbância é lida em um espectrofotômetro (HAYAT *et al*, 2018). As vantagens do método de Bradford são a velocidade, sensibilidade e reprodutibilidade, pois o processo de coloração leva em torno de dois minutos e sua estabilidade é de cerca de uma hora (BRADFORD, 1976), porém sua desvantagem é a pouca especificidade, já que outras moléculas absorvem o mesmo comprimento de onda das proteínas. É possível observar que vários outros kits podem ser

utilizados para avaliar permeabilidade de membranas celulares, sendo a utilização variada de acordo com o pesquisador, como o preço, a espécie bacteriana ou a substância antimicrobiana a ser avaliada.

Testes enzimáticos também são empregados em investigações do modo de ação de uma substância antibacteriana, sendo utilizado para monitoramento de metabolismo de microrganismos (ORENGA *et al*, 2009). Esses testes são utilizados porque muitas drogas atuam como inibidoras de enzimas, levando a morte do patógeno decorrente do bloqueio da atividade da biossíntese correspondente. O estudo da estrutura tridimensional da enzima é uma das técnicas aplicadas, onde se estuda o sítio ativo da enzima, de modo a prever quais moléculas serão ou não inibidoras (SRINIVASAN *et al*, 2019).

Os microrganismos conseguem desenvolver resistência a drogas por meio de variados mecanismos e, as bombas de efluxo são uma das vias envolvidas no fenômeno da multirresistência adquirida e intrínseca, sendo encontradas muito comumente em bactérias Gram-negativas (MOREIRA *et al*, 2005). A combinação de antibióticos afetados pelas bombas de efluxo com suas substâncias inibidoras tem um alto potencial no controle de bactérias, sendo portando muito investigada (WORTHINGTON e MELANDER, 2013). Para auxiliar essa investigação, uma técnica inclui a utilização de um composto chamado Hoechst 33342 (H33342), que é absorvido por células vivas e apresenta fluorescência (CHOI *et al*, 2017). Este método baseia-se no padrão de acúmulo do H33342 na membrana, que vai depender do grau de atividade da bomba de efluxo (RICHMOND *et al*, 2013). Portanto, caso uma substância seja adicionada e também seja substrato dessa bomba, fazendo com que iniba a atividade dela, o acúmulo de H33342 aumenta, tornando-se mais fluorescente.

Existem enzimas celulares que são essenciais para a divisão e crescimento bacteriano. Entre elas, pode-se citar as enzimas DNA-girase e a topoisomerase IV (envolvidas no enrolamento e na replicação do DNA) (XIAO *et al*, 2014), sendo de grande importância na investigação do modo de ação de substâncias antimicrobianas. O teste consiste em um kit capaz de monitorar o superenrolamento dependente de ATP de um DNA de plasmídeo circular, sendo os produtos separados e exibidos por eletroforese em gel de agarose (FISHER e PAN, 2008).

No que diz respeito à inibição da atividade da cadeia respiratória por um determinado fármaco antibacteriano, ensaios de medição do consumo de oxigênio

podem ser utilizados. Esses ensaios envolvem eletrodos de oxigênio em vesículas de membrana invertidas de uma espécie bacteriana usando diferentes substratos oxidáveis (INÁCIO *et al*, 2016). Outros efeitos relacionados à atividade respiratória de uma célula podem ser observados, como a relação entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e o estresse oxidativo, que podem levar à morte celular (LENNON *et al*, 2015). Sendo a produção de EROs o mecanismo de ação de algumas drogas. Alguns testes podem ser realizados para medir o grau dessa produção. Entre eles, pode-se citar o uso do antioxidante N-acetilcisteína (NAC) como controle (KIM *et al*, 2007) e o uso do corante diclorodihidrofluoresceína diacetado (H2DCFDA), que é um indicador intracelular de EROs (KORA e SASHIDHAR 2018; CHOI e HU, 2008).

Ainda existem experimentos, como os de “docking molecular”, que podem funcionar como preditores de afinidade entre duas moléculas, podendo ser úteis na confirmação de um resultado de uma atividade antimicrobiana já observada previamente (XIAO *et al*, 2014). Esta técnica utiliza simulação e análises de computador para, por exemplo, encontrar moléculas compatíveis e que possam ser utilizadas como substâncias bioativas, modificando-as e controlando-as (LENGAUER e RAREY, 1996). Muitos estudos nesta área envolvem interação entre proteínas, em especial aqueles cujo objetivo é encontrar moléculas que inibam a função de uma determinada proteína específica. Uma importante limitação deste método é a difícil previsibilidade dos complexos de ligantes de DNA, já que as drogas que se ligam a essa molécula normalmente causam alterações conformacionais nela (LENGAUER e RAREY, 1996).

Outra técnica que vem sendo empregada em estudos de mecanismo de ação é a utilização de biossensores bacterianos, que podem ser utilizados a fim de avaliar a toxicidade de determinadas substâncias. Esses biossensores são capazes de interagir com essas substâncias e produzir um sinal quantificável por meio de um transdutor, que pode ser um gene bioluminescente, como luxCDABE (TUMER *et al*, 1987; CHAN *et al*, 2013). Para esse método, as bactérias são transformadas com plasmídeos que contenham genes bioluminescentes e que possuem uma finalidade específica, como para observação de atividade metabólica ou medição de danos no DNA. Depois da preparação da amostra, a produção de luz é então medida por um leitor de microplaca e seu resultado é avaliado (CHAN *et al*, 2013).

Por fim, as técnicas mais utilizadas em estudos microbiológicos para os mais diversos fins são as técnicas microscópicas, especialmente com o uso da microscopia eletrônica. Esses equipamentos são utilizados na investigação de mecanismo de ação de fármacos antimicrobianos devido ao seu alto poder de resolução (0,2 nanômetros) (CARTER e SHIEH, 2015). A microscopia eletrônica de transmissão (MET) é utilizada para visualização e estudo de estruturas celulares internas, fornecendo imagens bidimensionais devido à utilização de um feixe de elétrons, que atravessa a seção de um espécime previamente preparado e corado com átomos de metais pesados e que possuem afinidade por determinados componentes celulares. No momento que os elétrons passam por esses componentes, os átomos são absorvidos formando o que se chama de áreas elétron-densas, possibilitando a visualização da imagem (CARTER e SHIEH, 2015). Já a microscopia eletrônica de varredura (MEV) fornece imagens tridimensionais, sendo útil para o estudo da superfície do espécime. Essa imagem tridimensional é devida à interação do feixe de elétrons e a superfície da amostra, que emite sinais para serem processados, coletados e traduzidos em um monitor, para a formação da imagem (GOLDSTEIN *et al*, 2003).

## 5 CONCLUSÃO

A pesquisa e a conseqüente descoberta de inúmeras substâncias antimicrobianas associadas aos seus respectivos modos de ação causam um otimismo para potenciais terapias futuras. Não se espera com essa revisão esgotar todos os métodos empregados para investigação do modo de ação de compostos antibacterianos, mas espera-se demonstrar que há uma grande variedade de métodos que podem ser utilizados e ilustrar parte dessa variedade, assim como apontar vantagens e desvantagens de alguns deles. Os protocolos das técnicas que se referem aos artigos citados da revisão estarão disponíveis no anexo A do presente trabalho. Além disso, é de se esperar que esta abordagem possa ser útil nas pesquisas futuras sobre mecanismos de ação como forma de facilitar o início dos experimentos.

Cabe salientar que este Trabalho de Conclusão de Curso é fruto de um artigo já publicado em 2020 na *Archives of Microbiology*, cuja primeira página do artigo foi colocado no anexo B.



## REFERÊNCIAS

Antibacterial agents in clinical development: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis. **World Health Organization** (2017 (WHO/EMP/IAU/2017.11). Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO), 2017a.

ARIAS, M *et al.* Hydroxy-tryptophan containing derivatives of tritrypticin: modification of antimicrobial activity and membrane interactions. **Biochim Biophys Acta**, v. 1848, n. 1, p. 277-288, 2015.

ASHTON L *et al.* Raman spectroscopy: lighting up the future of microbial identification. **Future Microbiol**, v. 6, n. 9, p. 991–997, 2011.

BELINATO, J. R. *et al.* Metabolômica microbiana: inovações e aplicações. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 42, n. 5, p. 546-559, 2019. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422019004500546&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422019004500546&lng=en&nrm=iso). Acessado em: 16 de março de 2021.

BRADFORD M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 7, n. 72, p. 248–254, 1976.

BRAGA K. M. S *et al.* Citometria De Fluxo: Histórico, Princípios Básicos E Aplicações Em Pesquisa. **Enciclopédia Biosfera**, v. 13, n. 23, p. 1–26, 2016.

CARTER M, SHIEH J. **Guide to research techniques in neuroscience**, 2 ed, Academic Press, Cambridge, 2015.

CARVALHO L. A. C. *et al.* (2015) Hb40–61a: novel analogues help expanding the knowledge on chemistry, properties and candidacidal action of this bovine  $\alpha$ -hemoglobin-derived peptide. **Biochimica et Biophysica Acta Biomembrane**, v. 1848, n. 12, p. 3140–3149, 2015.

Antibiotic resistance threats in the United States. Centers for Disease Control and Prevention, Office of Infectious Disease (2013). Disponível em: [https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html?CDC\\_AA\\_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fdrugresistance%2Fbiggest\\_threats.html](https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fdrugresistance%2Fbiggest_threats.html). Acessado em 30 abril de 2020.

CHAN A. C., AGER D., THOMPSON I.P. Resolving the mechanism of bacterial inhibition by plant secondary metabolites employing a combination of whole-cell biosensors. **J Microbiology Methods**, v. 93, n. 3, p. 209–217, 2013.

CHEHREHASA F. *et al.* EdU, a new thymidine analogue for labelling proliferating cells in the nervous system. **Journal Neuroscience Methods**, v. 177, n. 1, p. 122–130, 2009.

CHOI O, HU Z. Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria. **Environmental Science Technology**, v. 42, n. 12, p. 4583–4588, 2008.

CHOI I. S., KIM C. M., JANG S. J. Screening antibiotics using an hoechst 33342 dye-accumulation assay to detect efflux activity in acinetobacter baumannii clinical isolates. **Asian Biomedicine**, v.11, n. 4, p. 371–377, 2017.

DATTA A. *et al.* Mode of action of a designed antimicrobial peptide: high potency against *Cryptococcus neoformans*. **Biophysical Journal**, v. 111, n. 8, p. 1724–1737, 2016.

DHARA D. *et al.* New oxadiazole derivatives: synthesis and appraisal of their potential as antimicrobial agents. *Lett Drug Des Discov*, v. 14, n. 999, p.1, 2017.  
EPAND R. M., VOGEL H. J. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanism of action. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1462, n. 1–2, p.11–28, 1999.

FISHER L. M., PAN X. S. Methods to assay inhibitors of DNA gyrase and topoisomerase IV activities. In: Champney WS (ed) **New antibiotic targets: methods in molecular medicine**. Humana Press, Totowa, p. 142, 2008.

GAJDÁCS, M. The concept of an ideal antibiotic: implications for drug design. **Molecules**, v. 24, n. 5, p. 892, 2019.

GOLDSTEIN, J. *et al.* **Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis**, 3 ed. Springer, Berlin, 2003.

GUIDO R. V. C., ANDRICOPULO A. D., OLIVA G. Drug design, biotechnology and medicinal chemistry: applications to infectious diseases. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 81–98, 2010.

HAYAT S. *et al.* In vitro antibiofilm and anti-adhesion effects of magnesium oxide nanoparticles against antibiotic resistant bacteria. **Microbiology and Immunology**, v. 6, n. 4, p. 211–220, 2018.

HELANDER I. M., MATTILA-SANDHOLM T. Fluorometric assessment of Gram-negative bacterial permeabilization. **Journal Applied Microbiology**, v. 88, n. 2, p. 213–219, 2000.

HOERR, V. *et al.* Characterization and prediction of the mechanism of action of antibiotics through NMR metabolomics. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 82, 2016.

HUANG, W. E. *et al.* Shining light on the microbial world the application of Raman microspectroscopy. **Advances in Applied Microbiology**, v. 70, p. 153–186, 2010.

INÁCIO, Â. S. *et al.* Quaternary ammonium surfactant structure determines selective toxicity towards bacteria: mechanisms of action and clinical implications in antibacterial prophylaxis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 3, p. 641–654, 2016.

JAYACHANDRAN, S. Pre-antibiotics era to post-antibiotic era. **Journal of Indian Academy of Oral Medicine and Radiology**, v. 30, p.100–101, 2018.

JUNGBILUT, P. R. Proteome analysis of bacterial pathogens. **Microbes and Infection**, v. 3, n. 10, p. 831–840, 2001.

KIM, J. S. *et al.* Antimicrobial effects of silver nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 3, n. 1, p. 95–101, 2007.

KOOPMANS, T *et al.* Semisynthetic lipopeptides derived from nisin display antibacterial activity and lipid II binding on par with that of the parent compound. **Journal of the American Chemical Society**, v. 137, n. 29, p. 9382–9389, 2015.

KORA, A. J., SASHIDHAR, R. B. Biogenic silver nanoparticles synthesized with rhamnogalacturonan gum: antibacterial activity, cytotoxicity and its mode of action. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 11, n. 3, p. 313–323, 2018.

KRAEMER, G. R., LANDOLO, J. J. High-frequency transformation of *Staphylococcus aureus* by electroporation. **Current Microbiology**, v. 21, p. 373–376, 1990.

LENGAUER, T., RAREY, M. Computational methods for biomolecular docking. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 6, n. 3, p. 402–406, 1996.

LENNON, S. V., MARTIN, S. J., COTTER, T. G. Induction of apoptosis (programmed cell death) in tumour cell lines by widely diverging stimuli. **Biochemical Society Transactions**, v. 18, n. 2, p. 343–345, 2015.

LIU, Y. *et al.* Antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles against *Escherichia coli* 0157:H7. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 4, p. 1193–1201, 2009.

MICHIELS, J. E. *et al.* Molecular mechanisms and clinical implications of bacterial persistence. **Drug Resistance Updates**, v. 29, p. 76–89, 2016.

MILES, A. J., WALLACE, B. A. Circular dichroism spectroscopy of membrane proteins. **Chemical Society Reviews**, v. 45, n. 18, p. 4859–4872, 2016.

MOREIRA, M. A. S., SOUZA, E. C. D., MORAES, C. A. D. Multidrug efflux systems in Gram-negative bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 1–2, p.19–22, 2005.

MUTHAIYAN, A. *et al.* Transcriptional profiling reveals that daptomycin induces the *Staphylococcus aureus* cell wall stress stimulon and genes responsive to membrane depolarization. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 52, n. 3, p. 980–990, 2008.

ORENGA, S. *et al.* Enzymatic substrates in microbiology. **Journal of Microbiological Methods**, v. 79, n. 2, p. 139–155, 2009.

PANDEY, A., MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, v. 405, n. 6788, p. 837–846, 2000.

PARK, H. S. *et al.* Antistaphylococcal activities of CG400549, a new bacterial enoyl-acyl carrier protein reductase (FabI) inhibitor. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n. 3, p. 568–574, 2007.

PINTO, N. C. C. *et al.* Antimicrobial *Annona muricata* L. (soursop) extract targets the cell membranes of Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Industrial Crops**, v. 107, p. 332–340, 2017.

Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis. **World Health Organization** (2017(WHO/EMP/IAU/2017.12). Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO), 2017b.

RICHMOND, G. E., CHUA, K. L., PIDDOCK, L. J. V. Efflux in *Acinetobacter baumannii* can be determined by measuring accumulation of H33342 (bis-benzamide). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 7, p. 1594–1600, 2013.

SENGUPTA, S., CHATTOPADHYAY, M. K., GROSSART, H. P. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 1–13, 2013.

SIGNORETTO, C. *et al.* Effects of mushroom and chicory extracts on the shape, physiology and proteome of the cariogenic bacterium *Streptococcus mutans*. **BMC Complementary Alternative Medicine and Therapies**, v. 13, p.117, 2013.

SIRIYONG, T. *et al.* Conessine as a novel inhibitor of multidrug efflux pump systems in *Pseudomonas aeruginosa*. **BMC Complementary Alternative Medicine and Therapies**, v. 17, n. 1, p. 1–7, 2017.

SRINIVASAN, B. *et al.* Chemical space of *Escherichia coli* dihydrofolate reductase inhibitors: new approaches for discovering novel drugs for old bugs. **Medicinal Research Reviews**, v. 39, n. 2, p. 684–705, 2019.

TEKELI, Y. *et al.* Phenolic composition, antioxidant capacity of *Salvia verticillata* and effect on multidrug resistant bacteria by flowcytometry. **African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicines**, v. 11, n. 4, p. 47–152, 2014.

THEURETZBACHER, U. *et al.* The global preclinical antibacterial pipeline. **Natures Reviews Microbiology**, v. 18, p. 275–285, 2020.

THOMAS, L., MATTHIAS, R. Computational methods for biomolecular docking. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 6, n. 3, p. 402–406, 1996.

TURNER, A., KARUBE, I., WILSON, G. S. Biosensors: fundamentals and applications, 1 ed. Oxford University Press, Oxford, p. 770, 1987.

VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis part one: causes and threats. **P&T**, v. 40, n. 4, p. 278–283, 2015.

VOYTENA, A. P. L. **Caracterização do perfil químico e avaliação de segurança e eficácia in vitro do óleo de café (Coffea arabica L.) visando aplicação cosmética**. 2017. Doutorado em Biologia Celular e do Desenvolvimento – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

WORTHINGTON R. J., MELANDER, C. Combination approaches to combat multi-drug resistant bacteria. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 3, p.177–184, 2013.

XIAO, Z. P. Design, synthesis, and evaluation of novel fluoroquinolone-flavonoid hybrids as potent antibiotics against drugresistant microorganisms. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 80, p. 92–100, 2014.

YARLAGADDA, V. *et al.* Lipophilic vancomycin aglycon dimer with high activity against vancomycin-resistant bacteria. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Lett**, v. 25, n. 23, p. 5477–5480, 2015.

YUNG-SHARP, D., KUMAR, R. Protocols for the visualization of DNA in electrophoretic gels by a safe and inexpensive alternative to ethidium bromide. **Technique**, v. 3, p. 183–187, 1989.

## ANEXO – PROTOCOLOS

### 1. Protocolos para investigação de mecanismo de ação em macromoléculas celulares:

- Avaliação da síntese de DNA por meio da marcação EdU de acordo com Ferullo *et al* 2009 e Inacio *et al* 2015: para marcar células bacterianas replicantes, alíquotas de 2 mL das culturas bacterianas frescas são incubadas com a substância teste por 45 minutos em tubos cônicos de 15 mL e, em seguida, adicionadas com 24 µL de EdU (kit de imagem Invitrogen Click-iT Edu Alexa fluor 488 C10083), dando uma concentração final de 30 µg / mL. Após 15 minutos de incubação com EdU a 37 °C, a incorporação foi terminada e as células fixadas pela adição de 13 mL de metanol a 90% ou paraformaldeído na concentração final de 4% a 4 °C durante pelo menos a noite. As células fixadas podem ser armazenadas a 4 °C neste ponto. As células fixadas foram sedimentadas por centrifugação a 5.000 × g a 4 °C. O sobrenadante foi decantado e as células foram ressuspensas em 1,5 mL de PBS filtrado e transferidas para tubos de microcentrífuga. Após a peletização, o sobrenadante foi novamente removido e o pellet foi ressuspenso suavemente em 100 µL 0,5% de Triton X-100 em solução de PBS e incubado. A porcentagem de células em replicação é determinada por citometria de fluxo.
- Análise do conteúdo de DNA e ciclo celular de acordo com Ferullo *et al* 2009 e Inacio *et al* 2015: O conteúdo de DNA bacteriano por célula e o ciclo celular são determinados por citometria de fluxo. Após 1 hora de incubação com a substância teste, as células bacterianas são fixadas durante a noite em etanol 70% a 4 °C, centrifugadas para remover o etanol, lavadas duas vezes com citrato de sódio 50 mM pH 7,5 e ressuspensas no mesmo tampão. As bactérias são então tratadas com RNase A à uma concentração final de 250 µg / mL durante 1 hora a 37 °C. O DNA foi corado com SYTO 9 2,5 mM em PBS durante 1 hora à temperatura ambiente. Para avaliar o efeito da substância teste no tamanho da célula bacteriana, que é proporcional ao sinal de dispersão de luz direta, uma alíquota de cada amostra é coletada antes da

fixação e analisada imediatamente. Para examinar o ciclo celular bacteriano, após a incubação da substância teste, as culturas são cultivadas por mais 3 horas a 37 °C em condições de run-out. No final da incubação da substância teste, as células são lavadas e ressuspensas em meio bacteriano apropriado suplementado com 300 mg / L de rifampicina (inibidor de transcrição que bloqueia a iniciação da replicação do DNA) e 30 mg / L de cefalexina (inibidor da formação do septo e divisão celular). Depois disso, as amostras são processadas e coradas conforme descrito acima. As células cultivadas em meio mínimo M9 (M9) suplementado com 0,2% de glicose, cujas células estão circulando entre o conteúdo de DNA 1N (células contendo 1 cromossomo) e 2N (células com 2 cromossomos), são usadas para inferir 'N' posições na fluorescência intensidade do eixo x (escala linear).

- Quantificação dos níveis intracelulares de nucleotídeos de adenina de acordo com Inacio *et al* 2015: os níveis intracelulares de ATP, ADP e AMP são determinados por *HPLC* de fase reversa de par iônico (cromatografia líquida de alta pressão). Após 1 hora de exposição à substância teste, as culturas bacterianas são centrifugadas a 6000 g durante 5 minutos e ressuspensas em PBS frio. Uma alíquota da amostra é retirada para quantificação de proteínas pelo método do ácido bicinconínico (Piercew *BCA Protein Assay Kit*). A amostra restante é posteriormente tratada para extração de ácido nucleotídeo de adenina intracelular (ácido perclórico). A separação por *HPLC* de fase reversa é realizada a 20 °C usando uma coluna analítica C-18 combinada com uma coluna de guarda C-18 adequada. A separação é realizada a uma taxa de fluxo de 1,5 mL / min e detecção ultravioleta em 254 e 280 nm. Soluções estoque de ATP, ADP e AMP preparadas em água são usadas para calibração. A identidade do pico é determinada com base no tempo de retenção e no espectro. Os dados são normalizados para o conteúdo de proteína.
- Formação de plasmídeo recombinante para investigar mecanismo de ação de acordo com Radosti *et al* 2001 e Hee so Park *et al* 2007: esta técnica é baseada na superexpressão de um gene que codifica a

molécula alvo da substância de teste para a atividade antimicrobiana e sua comprovação por alteração resulta nos testes de suscetibilidade. O DNA genômico de uma cultura durante a noite de uma bactéria em estudo é isolado e o gene de interesse deve ser amplificado por PCR e clonado em um vetor específico (por exemplo, pE194 ou pCU1) produzindo o plasmídeo recombinante. O vetor selvagem e o vetor recombinante são então introduzidos nas bactérias do estudo por eletroporação. Em seguida, cepa de bactéria sem modificação, cepa de bactéria com vetor selvagem e cepa de bactéria com vetor recombinante são submetidas aos níveis de expressão do ensaio gênico avaliados pela técnica de Western Blot. Essas três cepas também são utilizadas para confirmar o modo de ação antibacteriana da substância testada, submetendo-as ao procedimento de ensaio de Concentração Inibitória Mínima (CIM).

- O efeito de peptídeos antimicrobianos pelo teste de mobilidade do DNA de acordo com Arias, Mauricio *et al.* 2015: para avaliar a ação antimicrobiana de um peptídeo que se liga ao DNA, pode-se utilizar o ensaio de retardamento em gel de agarose. O DNA de interesse é purificado a partir de células de microrganismos, e a concentração e pureza do DNA são medidas em A260 e A260 / A280, respectivamente. O DNA (100 ng) é incubado à temperatura ambiente com quantidades crescentes de peptídeos, correspondendo a proporções de peptídeo / DNA de 0–10 (p / p), em tampão de ligação (5% de glicerol, 10 mM de Tris, 1 mM de EDTA, 1 mM DTT, 20 mM KCl, 50 µg / mL BSA, pH 8,0). Após incubação por 1 hora, o corante de carregamento 5 × (10% Ficoll 400, 10 mM Tris, 50 mM EDTA, 0,25% de azul de bromofenol, pH 7,5) é adicionado à mistura e carregado em um gel de agarose 1% em Tris-acetato-EDTA (TAE) tampão contendo 50 µL de brometo de etídio para visualização. Os géis são executados a 100 V por 30 minutos e sua imagem tirada para análise.
- Avaliação da inibição da síntese macromolecular causada por peptídeos antimicrobianos de acordo com Arias *et al* 2015: A cultura noturna do microrganismo em estudo deve ser diluída em 10<sup>-3</sup> e deve crescer até a fase exponencial (avaliada por densidade óptica em 600



nm) Neste ponto, as células são centrifugadas e ressuspensas em mídia mínima M9. Alíquotas (300 µL) das suspensões de células são suplementadas com 9 µL de [3H] -timidina, [3H] -uridina ou [3H] -L-histidina e 100 mg / L dos outros dois precursores não marcados. Após 5 minutos de incubação a 37 °C, os peptídeos antimicrobianos a serem testados são adicionados em concentrações específicas, seguidos de incubação por mais 30 minutos a 37 °C. Em pontos de tempo de 0, 5, 15 e 30 minutos, amostras de 50 µL são retiradas das culturas e incubadas em 5 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% suplementado com 200 mg / L de todos os três precursores não marcados por 40 minutos no gelo, seguido por 15 minutos de incubação a 37 °C. O DNA, RNA e proteínas são coletados sob vácuo usando filtros de transferência de proteínas e ácidos nucleicos de 25 mm. Os filtros são enxaguados 10 vezes com TCA a 10% frio e secos a 70 °C. Cada filtro é colocado em um frasco de cintilação com 10 mL de cintilante de contagem biodegradável não aquoso BCS-NA e as contagens radioativas registradas por 1 minuto em um contador de cintilação multiuso. A fim de estabelecer como essas concentrações de peptídeos afetam o crescimento do microrganismo, um ensaio de crescimento separado é realizado. As células bacterianas são preparadas como descrito antes em meio mínimo M9 suplementado com 200 mg / L de todos os três precursores não marcados e incubados a 37 °C. Em cada momento, amostras de 5 µL foram diluídas 1: 4 × 10<sup>4</sup> em água e 100 µL semeadas em meio de ágar específico. Após incubação durante a noite a 37 °C, o número de colônias é contado.

- Detecção de alterações no espectro da macromolécula por espectroscopia Raman de acordo com Liu *et al* 2009: o sistema de espectrômetro Raman equipado com um microscópio e uma fonte de laser diodo infravermelho próximo 785 nm (máximo de 300 mW) é usado para este estudo. Os sinais de espalhamento Raman são detectados por um detector de matriz CCD de 578 x 385 pixels e os espectros Raman são adquiridos da cultura do microrganismo tratado com uma série de concentrações da substância a ser testada usando

uma objetiva de 50x com uma faixa de detecção de 600 a 1800  $\text{cm}^{-1}$  no modo estendido. A medição é realizada com tempo de exposição de 10 segundos e potência do laser de 10 mW.

- Avaliação da síntese de DNA, RNA e proteínas de acordo com Signoretto *et al* 2013: alíquotas de uma cultura em crescimento exponencial (150  $\mu\text{L}$ ) são colocadas em poços de uma placa de microtitulação junto com 5  $\mu\text{Ci}$  de [3 H] timidina (Act spec > 10 Ci / mmol) ou [3H] uridina Ac. > 20 Ci / mmol) ou [3H] leucina (act spec. 50 Ci / mmol). Em alguns poços, diluições adequadas dos compostos de teste são adicionadas. Cada determinação é realizada em triplicado. As placas de microtitulação são incubadas na atmosfera conveniente para o microrganismo em estudo por 60 minutos. No final deste tempo, a cultura é sobreposta em um papel de fibra de vidro Millipore GF / C embebido em ácido tricloroacético (TCA) 10% e imerso em uma solução fria de TCA a 10%. Os filtros são então lavados três vezes com TCA frio e finalmente duas vezes com acetona. A radioatividade é determinada com um contador de cintilação líquida. Os experimentos são repetidos três vezes.
- Extração de membrana e proteínas citoplasmáticas para análise proteômica de acordo com Signoretto *et al* 2013: um litro de cultura em crescimento exponencial do microrganismo em estudo e um litro da mesma cultura tratada por 60 minutos com 2x com a substância de teste são rapidamente resfriados gelo e imediatamente centrifugado a 5000 g por 10 minutos a 4 °C. Os sedimentos são lavados três vezes com tampão fosfato 50 mM (pH 7,2) e as células fragmentadas com contas de vidro (0,10 mm) em um Disruptor Celular sob fluxo contínuo de CO<sub>2</sub> para manter o frasco refrigerado. As células intactas são removidas por centrifugação a 2500 g durante 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante é centrifugado a 30.000 g durante 60 minutos. O sobrenadante (fração citoplasmática) é removido e o sedimento (membrana citoplasmática e parede celular) é lavado com tampão fosfato e centrifugado como acima três vezes. As frações citoplasmáticas tratadas e não tratadas do microrganismo são precipitadas com 15% de ácido tricloroacético (TCA) em gelo e

ressuspensas em 1 mL de solução contendo 1M Tris, 4M NaCl, 2% de brometo de cetil-trimetilamônio (CTAB) e 1 × comprimido para inibidores de protease. As proteínas são purificadas brevemente com 9 volumes de água bidestilada que são adicionados aos sobrenadantes e as amostras são centrifugadas a 20.000 g por 10 minutos para remover DNA e polissacarídeos. As proteínas são então precipitadas pela adição de 4 volumes de acetona fria e purificadas por centrifugação a 20.000 g durante 10 minutos. Para lavar os precipitados, utiliza-se o dobro do volume de etanol absoluto e o dobro da acetona. No que diz respeito às proteínas de membrana, o sedimento de membrana é ressuspense em HCO<sub>3</sub> 50 mM (NH<sub>4</sub> 500 mM) e 3 mL de uma mistura de trifluoroetanol / clorofórmio 2: 1 (v / v) é adicionado à amostra que foi mantida a 0 °C durante 1 hora em vórtice a cada 5 minutos por 10 segundos cada. A mistura é centrifugada a 10.000 g durante 5 minutos e a interface insolúvel é removida e a mistura restante é seca usando uma centrífuga de vácuo. O resíduo é suspenso num tampão de solubilização consistindo em ureia 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4%, ASB14 0,5%, Triton X-100 2%, anfólitos pH 3-10. As proteínas são então precipitadas pela adição de acetona / metanol 8: 1 (v / v) e purificadas por centrifugação a 20000 g durante 10 min. Todos os pellets de proteína resultantes de ambas as frações de citoplasma e membrana são solubilizados com uma solução contendo ureia 7 M, tiourea 2 M, CHAPS a 3%, Tris 20 mM. Em seguida, 1% de anfólito com pH 3-10 é adicionado e as amostras são centrifugadas por 30 minutos para remover os contaminantes residuais complexados com anfólitos. As amostras são incubadas com tributílfosfina 5 mM e acrilamida 20 mM durante 60 minutos à temperatura ambiente para reduzir as ligações de proteína dissulfeto e alquilação de grupos tiol de cisteína. A reação é bloqueada pela adição de DTT Q 10 mM e as amostras são armazenadas a -80 °C. A concentração de proteína é avaliada pelo ensaio de Bradford.

- Análise e separação de proteínas na mistura por eletroforese bidimensional (2-DE) de acordo com Signoretto *et al* 2013: o fracionamento de proteínas por 2-DE realiza por reidratação de tiras de

gradiente de pH de 7 cm de comprimento, pH 3-10 imobilizado por 6 horas com 150  $\mu$ L da solução de amostra contendo 800  $\mu$ g de proteína total das células do microrganismo em estudo. A focagem isoeletrica (IEF) é realizada com uma célula IEF proteana, com uma baixa tensão inicial e, em seguida, aplicando um gradiente de tensão de até 5000 V com uma corrente limite de 50  $\mu$ A / tira e a temperatura é ajustada em 20 °C. Para a segunda dimensão, as tiras são equilibradas por 26 min balançando em uma solução de ureia 6 M, 2% SDS, 20% glicerol, 375 mM Tris-HCl, pH 8,8. As tiras são então colocadas em gradiente de 10-20% SDS-PAGE com 0,5% de agarose no tampão de cátodo (192 mM de glicina, 0,1% de SDS e Tris-HCl para pH 8,3). A corrida eletroforética é realizada definindo uma corrente de 5 mA para cada gel por 30 minutos, depois 10 mA / gel por 1 hora e 20 mA / gel até o final da corrida. Durante a execução, a temperatura atinge 11 ° C. As manchas de proteína são reveladas com a coloração Sypro Ruby. A análise de imagem das réplicas de géis 2D é realizada pelo software PDQuest (Bio-Rad), versão 7.3. Cada gel é analisado para detecção de pontos, subtração de fundo e quantificação de intensidade de DO de pontos de proteína. A imagem do gel que mostra o maior número de manchas e o melhor padrão de proteína é escolhida como modelo de referência, e as manchas em um gel padrão são então combinadas em todos os géis. Os valores da quantidade de pontos são normalizados em cada gel dividindo a quantidade bruta de cada ponto pela quantidade total de todos os pontos incluídos no gel padrão. Duas análises diferenciais distintas são realizadas, uma para proteínas citoplasmáticas e outra para frações de membrana. Em ambos os experimentos os géis são divididos em dois grupos separados (amostras de controle e tratadas) e, para cada mancha de proteína, o valor médio da quantidade de mancha e seu coeficiente de variância em cada grupo são determinados. Um teste de *Student* é realizado para comparar os dois grupos e identificar conjuntos de proteínas que apresentam uma diferença estatisticamente significativa com um nível de confiança de 0,05.

- Sequenciamento de peptídeos por nano *HPLC-ESI-MS / MS* de acordo com Signoretto *et al* 2013: as misturas de peptídeos são separadas usando um sistema *Nano flow-HPLC*. Um volume de amostra de 10  $\mu$ L é carregado pelo amostrador automático em uma pré-coluna de sílica fundida de 0,3 mm (75  $\mu$ m I.D., 375  $\mu$ m O.D.) a uma taxa de fluxo de 10  $\mu$ L / min. A eluição sequencial de peptídeos é realizada usando uma taxa de fluxo de 250 nL / min e um gradiente linear da Solução A (2% de acetonitrila; 0,1% de ácido fórmico) a 50% da Solução B (98% de acetonitrila; 0,1% de ácido fórmico) em 40 minutos na pré-coluna em linha com uma coluna de resolução de 15 cm (75  $\mu$ m ID; 375  $\mu$ m OD). Os peptídeos são eluídos diretamente em um analisador de massas do tipo *ion trap*. A tensão capilar era de 1,5-2 kV e uma taxa de fluxo de gás seco de 10 L / min é usada com uma temperatura de 230 °C. O intervalo de varredura usado é de 300 a 1800 m / z. A identificação de proteínas pode ser realizada pelo *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) usando o programa Mascot (<http://www.matrixscience.com>). Os seguintes parâmetros podem ser adotados para pesquisas de banco de dados: carbamidometilação completa de cisteínas e oxidação parcial de metioninas, tolerância de massa de peptídeo  $\pm$  1,2 Da, tolerância de massa de fragmento  $\pm$  0,9 Da, clivagens perdidas 2. Para identificação positiva, a pontuação do resultado de  $[- 10 \times \text{Log} (P)]$  deve estar acima do nível de significância limite ( $p < 0,05$ ).

## 2. Protocolos para investigação do mecanismo de ação em membranas celulares:

- Medição da permeabilidade da membrana através do teste de captação de 1-N-fenilnaftilamina (NPN) de acordo com Siryong *et al* 2017: culturas bacterianas de crescimento noturno são inoculadas em caldo nutriente e centrifugadas a 250 rpm a 37 °C por 4-5 horas. As células bacterianas são colhidas por centrifugação a 3000 rpm durante 15 minutos, lavadas com NaCl 100 mM e tampão de fosfato de sódio 50 mM (pH 7,0) e ressuspensas no mesmo tampão a  $A_{600} = 0,1$  na presença de 0,05% de glucose. Uma alíquota de 100  $\mu$ L da suspensão

bacteriana é adicionada a um poço em uma placa de microtitulação preta contendo 50  $\mu\text{L}$  da substância de teste a uma concentração de 20 mg / L e em outro poço contendo EDTA (100  $\mu\text{M}$ ) controle positivo seguido por adição de 50  $\mu\text{L}$  de NPN (40  $\mu\text{M}$ ) em ambos os poços. A concentração final de DMSO em todos os ensaios foi  $<1\%$ . A intensidade de fluorescência NPN (excitação a 322 nm e emissão a 424 nm) é monitorada a 37 °C após 2,30 minutos durante 1 hora usando um leitor multimodo de varredura espectral. Cada ensaio deve ser repetido pelo menos duas vezes.

- Avaliação da permeabilidade da membrana usando PI e SYTO 13 analisada por citometria de fluxo de acordo com Tekeli *et al* 2014: primeiro, devem ser estabelecidas as condições ideais de quantidade da substância teste, cultura bacteriana e concentrações dos compostos fluorescentes PI e SYTO 13. As culturas bacterianas são cultivadas a 37 °C em caldo nutriente. Posteriormente, as culturas são diluídas a uma concentração de  $10^7$  CFU / mL em um tampão de fosfato. As concentrações de PI e SYTO 13 são aplicadas de forma diferente para os diferentes microrganismos do estudo. Para o controle positivo (cepas multirresistentes), concentrações de PI e SYTO 13 são adicionadas em 500  $\mu\text{L}$  de cultura bacteriana e incubadas a 70 °C por 1 hora. Para o controle negativo (cepas não multirresistentes), 200  $\mu\text{L}$  de DMSO (10%) são adicionados e incubados a 25 °C por 1 hora. Para todas as amostras nas quais a substância em estudo será testada, o procedimento deve ser o mesmo que para o controle negativo; no entanto, em vez de usar a solução de DMSO, as soluções de substância de teste são usadas nos tubos de ensaio. Finalmente, os tubos de ensaio são examinados usando um citômetro de fluxo.
- Avaliação da permeabilidade das membranas por vazamento do corante calceína de acordo com Arias *et al* 2015: a liberação de calceína da cultura do microrganismo é registrada por espectroscopia de fluorescência, que foi medida em um fluorômetro. Amostras contendo calceína 10  $\mu\text{M}$  são incubadas em tampão Tris e a fluorescência é registrada a 520 nm (abertura numérica de 10 nm) por 1 min com excitação a 490 nm (largura da fenda de 10 nm). Em

seguida, a substância de teste é adicionada em diferentes concentrações e a fluorescência é registrada por mais 15 min. Neste ponto, todas as células de cultura são solubilizadas em 0,02% Triton X-100 e a fluorescência registrada por mais um minuto. A porcentagem de vazamento é calculada de acordo com a equação: % de vazamento de calceína =  $100 \times (I - I_0) / (I_t - I_0)$ , onde  $I_0$  é a fluorescência antes da adição da substância de teste,  $I$  é a fluorescência 10 minutos após adição da substância de teste e  $I_t$  é a fluorescência após a adição de Triton X-100.

- Avaliação da desintegração do envelope celular por meio da quantificação do vazamento de proteína pelo ensaio de Bradford de acordo com Hayat *et al.* (2018) e Bradford (1976): para estimativa de vazamento de proteína celular, inóculo bacteriano a uma densidade final de  $5 \times 10^5$  CFU / mL é adicionado ao meio adequado para um determinado microrganismo com várias concentrações da substância de teste. As células cultivadas em meio sem substância de teste são utilizadas como controle. Cada cultura é colocada em uma incubadora com agitação por 12 h a 37 °C. Após a incubação, 1 mL de cada cultura é colhido por centrifugação por 30 minutos ( $300 \times g$ , a 4 °C) e o sobrenadante coletado é usado para a estimativa da proteína usando o ensaio de Bradford. Para o ensaio de Bradford, a preparação do reagente de proteína é necessária. *Coomassie Brilliant Blue G-250* (100 mg) é dissolvido em 50 mL de etanol a 95%. A esta solução são adicionados 100 mL de ácido fosfórico a 85% (p / v). A solução resultante é diluída para um volume final de 1 L. As concentrações finais no reagente são 0,01% (w / v) *Coomassie Brilliant Blue G-250*, 4,7% (w / v) etanol e 8,5% (w / v) ácido fosfórico. Finalmente, o ensaio de Bradford pode ser feito. A solução de proteína contendo 10 a 100 µg de proteína em um volume de até 0,1 mL é pipetada para tubos de ensaio de 12 x 100 mm. O volume no tubo de ensaio é ajustado para 0,1 mL com tampão apropriado. Cinco mililitros de reagente de proteína são adicionados ao tubo de ensaio e o conteúdo é misturado por inversão ou vórtex. A absorbância a 595 nm é medida após 2 minutos e antes de 1 hora em cubetas de 3 mL contra um branco

preparado a partir de 0,1 mL do tampão apropriado e 5 mL de reagente de proteína. O peso da proteína é plotado contra a absorbância correspondente, resultando em uma curva padrão usada para determinar a proteína em amostras desconhecidas.

- Medição da permeabilidade da membrana com cristal violeta de acordo com Halder *et al.* (2015) e Khan *et al.* (2017): alterações na permeabilidade da membrana podem ser avaliadas pelo ensaio *Violet Crystal* (VC). A cepa cultivada com microrganismo fresco ( $10^8$  CFU / mL) em caldo é inoculada em tubos suplementados com a substância de teste e uma substância de controle positivo (ambos em valores de CIM) a 37 ° C e incubados por 4 horas. As suspensões de células dos microrganismos são centrifugadas a 1000 g por 10 min e o *pellet* é ressuspensão em 10 µg / mL de solução de VC preparada em água estéril para incubação adicional por 10 minutos a 37 °C. Após a incubação, os tubos são centrifugados a 1000 g durante 15 minutos e a DO do sobrenadante é medida a um comprimento de onda de 750 nm em um espectrofotômetro. O sobrenadante OD do grupo de células normais não tratado é usado como controle de crescimento. O valor OD da solução VC é considerado 100%. A porcentagem de absorção de VC é expressa da seguinte forma:  $(\text{valor OD da amostra} / \text{valor OD da solução com VC}) \times 100 = \text{porcentagem de absorção de VC}$ .
- Teste morfológico por microscópio eletrônico de transmissão de acordo com Liu *et al.* (2009): o efeito de uma substância pode ser observado diretamente por meio do MET. Culturas de microrganismos tratados e não tratados com a substância de teste devem ser incubados durante a noite a 37 °C e, em seguida, colocados em um micro-ondas preparado sob condições de vácuo a 120 W. As amostras são enxaguadas várias vezes com 0,1 mol de tampão cacodilato e embebidas em HistoGel, seguido por fixação secundária tamponada em micro-ondas (0,1 mol  $10^{-1}$  de cacodilato, 0,01 mol  $10^{-1}$  de 2-mercaptoetanol, 0,13 mol  $10^{-1}$  de sacarose) e 1% de tetróxido de ósmio. As amostras são então enxaguadas rapidamente 3x com o tampão descrito acima e enxaguadas novamente 3x (5 minutos cada) com água ultrapura, seguido por desidratação com soluções de etanol (20%, 50%, 70%,



90% e 100%) e então com uma solução de acetona 100%. As amostras são infiltradas com resina e polimerizadas a 60 °C por 24 horas. As amostras do bloco são processadas em finas seções de 85 nm com um ultramicrotomo. Essas seções podem ser colocadas em grades finas de 200 mesh e colocadas por 20 min com 5% de acetato de uranila e 10 minutos com a coloração de chumbo triplo Sato para observação posterior em um MET.

- Avaliação do potencial de membrana bacteriana segundo Inácio *et al.* (2016): a análise do potencial de membrana do microrganismo é realizada usando a sonda sensível ao potencial de membrana Rh123. Após 1 hora de incubação com a substância de teste, as células são lavadas e ressuspensas em PBS com 10 mg / L de Rh123 e incubadas a 37 °C por 30 minutos, após disso as células são lavadas novamente e ressuspensas em PBS para análise de citometria de fluxo. A captação e o acúmulo de Rh123 no citoplasma bacteriano, em resposta ao potencial elétrico através da membrana plasmática, induz a supressão da fluorescência, de modo que um aumento na fluorescência corresponde à despolarização da membrana. Como controle positivo, a despolarização da membrana é induzida por tratamento com antimicrobiano específico por 10 minutos a 37 °C antes da marcação das células.
- Avaliação da permeabilidade da membrana de células de levedura com 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) de acordo com Carvalho *et al.* (2015): células de microrganismos ( $2 \times 10^6$ ) são tratadas com várias concentrações da substância de teste por 1 hora a 37 °C, fixadas com formaldeído 0,37%, coletadas, lavadas com PBS (pH 7,4) e incubadas com 3,75  $\mu$ M de DPH por 45 min a 37 °C e finalmente lavado com PDB. A fluorescência é medida em 450 nm (excitação a 350 nm) usando um espectrofotômetro porque DPH é uma sonda fluorogênica classicamente usada para examinar os efeitos de drogas ativas na membrana devido às suas características ópticas fortemente dependentes do ambiente: interação com a região hidrofóbica dos resultados da membrana em um aumento acentuado no sinal de

fluorescência em 450 nm (excitação em 350 nm); a exposição à água resulta em grande diminuição desse sinal.

3. Protocolos para investigação do mecanismo de ação no metabolismo celular:

- Avaliação potencial do inibidor da bomba de efluxo pelo ensaio de acumulação H33342 de acordo com Siriyong *et al.* (2017): culturas bacterianas de crescimento durante a noite são inoculadas em caldo MH e giradas a 250 rpm a 37 °C por 4-5 horas. As células bacterianas são colhidas por centrifugação (3000 rpm durante 15 minutos) e depois lavadas com solução salina tamponada com fosfato contendo MgSO<sub>4</sub> 1 mM e glucose 20 mM. Após a centrifugação, os *pellets* são ressuspensos no mesmo tampão e a DO600 de cada suspensão é ajustada para 0,4. Uma alíquota de 100 µL da suspensão bacteriana é adicionada a um poço em uma placa de microtitulação preta contendo cada 50 µL da substância de teste (20 mg / L) e em outro poço contendo um inibidor da bomba de efluxo de controle positivo, PAβN (25 mg / L) A concentração final de DMSO em todos os ensaios é <1%. As placas são incubadas a 37 °C por 15 minutos e 50 µL de H33342 (2,5 µM) são adicionados a cada poço. A fluorescência (excitação a 355 nm, emissão a 460 nm) é medida a 37 °C a cada 2,30 minutos durante 1 hora usando um leitor multimodo de varredura espectral.
- Ensaio enzimático que avalia o potencial de inibição da DNA girase pela substância teste de acordo com Xiao *et al.* (2014): A atividade de superenrolamento de DNA pode ser testada com DNA pBR322 relaxado como substrato de acordo com o protocolo do fabricante. A mistura de reação padrão (20 mL) continha TriseHCl 35 mM (pH 7,5), KCl 24 mM, MgCl 2 4 mM, ditiotretitol 2 mM, espermidina 1,8 mM, ATP 1 mM, glicerol 6,5%, albumina de soro bovino 0,1 mg / mL), 12,5 ng / mL de pBR322 relaxado e 5 U de girase de DNA. A mistura reaccional é incubada a 37 °C durante 40 minutos com a substância de teste e depois terminada pela adição do corante de carga (3,5 mL) e 20 mL de clorofórmio / álcool isoamílico (24: 1). Após um breve vórtice, a fase

azul água é analisada por eletroforese em agarose a 1%. Uma unidade de atividade de superenrolamento é definida como a quantidade de DNA girase necessária para superenrolar 0,5 mg de plasmídeo em 1 hora. O IC 50 é definido como a concentração do fármaco que reduziu em 50% a atividade enzimática observada com controles sem fármaco.

- Mensuração do consumo de oxigênio por meio de vesículas de membrana invertida segundo Inácio *et al.* (2016) e Futai (1974): o efeito da substância teste na respiração aeróbia do microrganismo é medido em vesículas de membrana de dentro para fora preparada a partir de protoplastos. Para preparar as vesículas, os esferoplastos do estudo do microrganismo são suspensos em 5 mL de tampão de fosfato de potássio 0,01 M (pH 7,0) contendo 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 22 µg de álcool desidrogenase, 2 mM de NAD e 10 µg de ribonuclease e 10 µg de desoxirribonuclease / mL. Os esferoplastos são dispersos por meio de uma seringa hipodérmica equipada com uma agulha de calibre 18. Após uma dispersão aparentemente completa, a suspensão é homogeneizada, forçando-a pela agulha da seringa mais cinco vezes. A mistura é incubada à temperatura adequada para o microrganismo por 30 minutos em um banho de agitação rotativo e centrifugada a 2500 x g por 20 minutos para remover células inteiras e esferoplastos não lisados. O sobrenadante é centrifugado a 100.000 x g por 20 minutos. O sedimento é suspenso em 10 mL de tampão de fosfato de potássio 0,05 M (pH 7,0) e centrifugado a aproximadamente 100.000 x g por 20 minutos. O material sobrenadante é descartado e o sedimento é suspenso em fosfato de potássio 0,05 M (pH 7,0) a uma concentração de proteína de cerca de 10 mg / mL. Os experimentos com essas vesículas devem ser realizados no dia da preparação porque as vesículas armazenadas durante a noite em um banho de gelo ou a -80 ° C perderam cerca de metade de sua atividade de absorção de prolina. A cultura do microrganismo é cultivada até uma DO de 0,9-1,0 a 450 nm e os protoplastos são preparados usando lisozima e EDTA, coletados por centrifugação e depois incubados por 15 minutos com 10 mg / L de DNase e 10 mg / L de RNase A (em 0,01 M Tris / MgCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 7,4) a 37 ° C. A mistura é então passada por

uma prensa francesa (2000 psi). Após centrifugação, as vesículas são ressuspensas em Tris-HCl 0,01 M e MgCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 7,4. O consumo de oxigênio por vesículas de membrana invertidas é medido polarograficamente com um eletrodo de oxigênio do tipo Clark instalado em uma câmara fechada com camisa de água de 1 mL, a 37 °C em um tampão contendo Tris 10 mM / MgCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 7,4. Os experimentos são realizados com 1 mg de proteína. As vesículas são incubadas com diferentes concentrações da substância de teste durante 5 minutos antes da energização com NADH 1 mM ou com succinato 7,5 mM.

- Avaliação da redução da atividade metabólica por meio de biossensores segundo Chan *et al* (2013): o ensaio do biossensor bacteriano deve ser realizado nas CIMs iniciais previamente estabelecidas. Além disso, o tratamento com a concentração 2x na CIM inicial pode ser usado para comparar os efeitos citotóxicos na célula. Suspensões congeladas de células biossensoras são ressuspensas com 2 mL de água deionizada estéril (DW) em cada frasco e incubadas a 25 ° C por 2 h. As suspensões de células são então centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos, seguido pela remoção do sobrenadante e ressuspensão em 2 mL de DW estéril. As células ressuscitadas são diluídas 10 vezes em soluções MIC para a substância de teste e em DW estéril como controle. As células biorreportadoras são expostas às concentrações determinadas da substância por 30 minutos e, em seguida, transferidas para uma microplaca preta de 96 poços com 200 µL de amostra distribuída em cada poço. A produção de luz é medida usando um leitor de microplacas multi-deteção. Os níveis de luminescência são expressos em unidades relacionadas à luz (RLUs) e a intensidade da luz pelas células biológicas tratadas é expressa como porcentagem do controle não tratado. Dezesesseis leituras (duas linhas de uma microplaca de 96 poços) são coletadas para cada amostra para cada execução e o experimento como um todo é repetido pelo menos três vezes. Após o teste, diluições das amostras do biossensor do estudo bioluminescente são preparadas e subcultivadas em ágar com determinada

concentração, para controle positivo, de um antimicrobiano já estabelecido para o tipo de microrganismo em questão. As placas de ágar são inoculadas e incubadas a 37 °C durante 16 horas e as colônias contadas como UFC / mL. O mesmo é feito para a substância de teste a fim de comparar os valores de RLU do estudo de bioluminescência com os valores da Unidade de Formação de Colônias (UFC) / mL. Este teste também é feito em triplicado.

- Avaliação da inibição da bomba de efluxo usando HEPES de acordo com Xiao *et al.* (2014): as cepas são cultivadas em meio adequado dependendo do microrganismo para uma densidade óptica a 600 nm (OD600) de 0,6. As células são então recolhidas por centrifugação a 6000 x g durante 5 minutos e lavadas três vezes com HEPES 20 mM (pH 7,0). Os pellets de células são ressuspensos em HEPES com concentração final de 40 mg / mL. Posteriormente, as concentrações adequadas da substância em estudo são adicionadas às misturas de ensaio. Após incubação durante 5 minutos a 37 °C, as amostras de 1 mL são diluídas com um volume igual de HEPES gelado e centrifugadas a 16.000 x g durante 2 minutos a 4 °C. Os sedimentos resultantes são lavados uma vez com 2 mL de HEPES gelado e ressuspensos em 1 mL de glicina-HCl 100 mM (pH 3,0). As suspensões são agitadas vigorosamente durante 4 horas à temperatura ambiente para libertar a substância de teste intracelular. As amostras são centrifugadas a 16.000 x g durante 5 minutos à temperatura ambiente. A fluorescência no sobrenadante é medida com um espectrofluorômetro usando a excitação apropriada e os máximos de emissão. A acumulação intracelular do antibiótico nas amostras é calculada por comparação com curvas padrão e é dada em nanogramas por miligrama (ng / mg) de bactéria. Pode ser adicionado cianeto de carbonila m-clorofenilhidrazona com uma concentração final de 100 mM para o controle positivo. As taxas de efluxo são calculadas com base na seguinte fórmula: taxa de efluxo = (controle acumulado - teste acumulado ÷ controle acumulado) x 100.

4. Protocolos para investigação do mecanismo de ação em características morfológicas celulares:

- Observação de alterações morfológicas celulares por microscópio eletrônico de varredura de acordo com Liu *et al.* (2009): as amostras microbianas devem ser comparadas antes e depois do teste com a substância em estudo para fins de comparação. Primeiro, as células do microrganismo devem ser fixadas com um fixador primário (glutaraldeído 2-5%, paraformaldeído 2% em tampão cacodilato de sódio 0,1 mol 0,1 mol, pH 7,35) por 30 minutos. As amostras são então lavadas três vezes com água ultrapura, seguida de desidratação com uma série de soluções de etanol (10%, 30%, 50%, 70%, 90% e 100%). As amostras desidratadas são imediatamente secas por um secador de pontos crítico, seguido pela montagem em *stubs SEM* e revestimento por pulverização com uma fina camada de carbono. As amostras revestidas podem então ser observadas em SEM a uma voltagem de 5 kV.


## ANEXO B – IMAGEM DO ARTIGO PUBLICADO

Archives of Microbiology  
<https://doi.org/10.1007/s00203-020-01959-z>

MINI-REVIEW



### Searching for mechanisms of action of antimicrobials

Ana Bárbara Polo<sup>1</sup> · Rodrigo Luiz Fabri<sup>2</sup> · Ana Carolina Morais Apolônio<sup>1</sup> 

Received: 10 March 2020 / Revised: 5 June 2020 / Accepted: 15 June 2020  
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

#### Abstract

Although development of antimicrobial resistance by bacteria is a natural phenomenon, the antibiotic resistance crisis is a reality that leads us in a gap of antimicrobial alternatives on therapeutics. Considering this cruel reality and committed to contribute to look for new antibacterial agents, this manuscript presents a review of easy laboratory methods that evaluate the mode of action of compounds, since it is a basic requirement for the discovery and development of new drugs. The literature was screened by searching the keywords “mode of action”, “antibiotic”, “antimicrobial activity”, “inhibition mode”, “method” and “bacteria” in Pubmed, Scopus, Science Direct and BVS in a period of time from 2000 to 2019. This review demonstrates the wide variety of methods that can be employed in research on mechanisms of action of antibacterial substances. Therefore, we compiled different protocols (presented in the supplementary material), available in the literature, with the purpose of facilitating the start of experiments.

**Keywords** Drug screening · Antibiotic resistance · Drug development · Mode of action