

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Avaliação das propriedades antibacterianas de cianobactérias  
de água doce para aplicação em antibióticos naturais**

Iara Raquel Lopes Dias

**Mestrado em Biologia Humana e Ambiente**

Dissertação orientada por:  
Doutora Elsa Dias (INSA)  
Professora Doutora Deodália Dias (FCUL)

2021

## **Nota prévia**

A componente do trabalho que envolveu os testes com as bactérias patogénicas foi realizado no Laboratório Nacional de Referência da Resistência aos Antibióticos e Infecções Associadas aos Cuidados de Saúde (LNR-RA/IACS), Departamento de Doenças Infeciosas do INSA.

A Mestre Carina Menezes foi responsável pela coorientação desta dissertação.

As referências bibliográficas desta dissertação estão escritas de acordo com as normas da revista *Marine Drugs*.

A escrita deste documento seguiu as regras do acordo ortográfico em vigor.

## **Agradecimentos**

Começo por agradecer à minha orientadora Doutora Elsa Dias e à minha coorientadora Mestre Carina Menezes. Obrigada por me terem permitido e ajudado a realizar este trabalho, com todas as etapas que envolveu e todos os contratemplos que foram surgindo. Mas acima de tudo, quero agradecer-vos pela partilha de tantos ensinamentos, pelas conversas de motivação e apoio a vários níveis, e pelos momentos de boa disposição frequentes. Guardo tudo com muita admiração e carinho e por vós.

Agradeço também à minha orientadora interna, a Professora Doutora Deodália Dias, pela constante disponibilidade, atenção e acompanhamento durante todo o mestrado, e em particular pela disposição e prontidão demonstradas na resolução de questões que apareceram ao longo da realização deste trabalho.

Ao INSA, pela disponibilização de instalações, equipamentos e materiais necessários à concretização deste trabalho. Em particular, agradeço ao Laboratório Nacional de Referência da Resistência aos Antibióticos e Infecções Associadas aos Cuidados de Saúde (LNR-RA/IACS), do Departamento de Doenças Infecciosas do INSA, e ao Departamento de Alimentação e Nutrição, por terem cedido material biológico e equipamentos imprescindíveis à concretização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Biologia e Ecotoxicologia do Departamento de Saúde Ambiental, por terem sido sempre tão atenciosos e simpáticos para comigo. Um especial agradecimento à Doutora Tânia Rosado, por toda a paciência, apoio e partilha de conhecimento desde o primeiro dia em que entrei neste laboratório.

Aos meus amigos, por tantas aventuras vividas, tantos momentos partilhados e pela compreensão e apoio constantes. Dos mais recentes aos mais antigos, cada um de vocês é insubstituível na minha vida. Gosto tanto de vocês todos. Em particular, agradeço à Andreia, Daniela e Mariana, por terem sido mais do que fundamentais ao longo desta etapa. Ouviram, compreenderam e partilharam das minhas preocupações e anseios, e animaram-me sempre. Obrigada amigas.

À minha família, avós, tios e primos, por me acompanharem, apoiarem e se entusiasmarem com as minhas conquistas. Ao meu sobrinho Eduardo, agradeço por ser a representação de pureza e leveza nas nossas vidas, e sobretudo por me alegrar todos os dias. Obrigada, amor da tia.

Às minhas irmãs, Ana e Íris, pelo companheirismo e tarouquice de sempre. Crescer convosco é do que sou mais grata. Ensinam-me tanto, todos os dias. Quero rir e chorar convosco até sermos velhinhas. Obrigada por aturarem a vossa irmã do meio.

À minha mãe, o meu maior agradecimento. Obrigada por tudo o que fizeste e fazes por nós. Tu e as manas são as mulheres da minha vida, a minha maior força e inspiração diária. Obrigada pelo especial amparo durante este ano tão desafiante para mim. Tudo é mais fácil do vosso lado. Obrigada pelo amor incondicional em todas as horas. O meu amor por vocês é desmedido.

Por fim, agradeço a todos os que se foram cruzando comigo e contribuíram de alguma forma. Obrigada a todos!

## Abstract

The discovery of antibiotics revolutionized the treatment of infectious diseases. However, the efficiency of antibiotics has been compromised by the worldwide spread of antibiotic resistance mechanisms, and the research of new antibacterial compounds is needed. Cyanobacteria have been studied for the production of secondary metabolites with antibacterial activity.

The aim of this study was to assess the antibacterial activity of twenty-five cyanobacterial strains belonging to ESSACC collection. In that way, extracts of these cyanobacteria were prepared with hexane, dichloromethane:methanol (2:1), methanol (70%) and water. Two sequential extractions were performed: (I) non-polar to polar solvents; (II) polar to non-polar solvents. The susceptibility phenotype of nine pathogenic bacteria to these extracts was analyzed by the Disk Diffusion and the Microdilution assays.

In the Disk Diffusion method, none of the cyanobacterial extracts completely inhibited the growth of the studied bacteria. However, the bacterial growth of *P. aeruginosa* ATCC 27853 decreased when exposed to the extracts of hexane (I) of *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088), methanol (II) of *Oscillatoria limosa* (SAG 42.87), dichlorometane:methanol (I)/ methanol (I) of *Arthrospira platensis* (SAG 85.79) and dichlorometane:methanol (I)/(II) of *Nostoc* sp. (LMECYA 330). In the Microdilution method, only the methanolic extract (I) of *A. platensis* (SAG 85.79), at 25% v/v, fully inhibited the growth of *P. aeruginosa* ATCC 27853. Additionally, the adjuvant activity of those extracts on standard antibiotics for *P. aeruginosa* was analyzed, and all the extracts exacerbate the antibacterial activity of aztreonam and piperacillin/tazobactam, except for the dichlorometane:methanol extract (I) of *A. platensis* (SAG 85.79) that only exacerbate the activity of aztraeonam. Furthermore, the dichlorometane:methanol extract (I) of *Nostoc* sp. (LMECYA 330) exhibit synergic activity with ertapenem.

These results contributed to the identification of four cyanobacterial strains as potential sources of antibacterial compounds, which might be employed to mitigate the current scenario of antibiotic resistance.

Keywords: antibiotic resistance, natural bioactive compounds, cyanobacteria, antibacterial activity, adjuvants

## Resumo

A descoberta dos antibióticos revolucionou a medicina, mas a sua eficácia está comprometida devido à disseminação de mecanismos de resistência a antibióticos, sendo urgente pesquisar novos compostos antibacterianos. As cianobactérias têm sido estudadas quanto à produção de metabolitos secundários com atividade antibacteriana.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade antibacteriana de vinte e cinco estirpes de cianobactérias pertencentes à coleção ESSACC. Para tal, foram produzidos extratos de hexano, diclorometano:metanol (2:1), metanol 70% e água destas estirpes, em duas extrações sequenciais com estes solventes: (I) do menos polar para o mais polar; (II) do mais polar para o menos polar. O fenótipo de suscetibilidade de nove bactérias patogênicas a esses extratos foi avaliado pelos métodos da Difusão em Disco e da Microdiluição.

Pelo método da Difusão em Disco nenhum dos extratos inibiu totalmente o crescimento bacteriano. No entanto, houve um decréscimo do crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 quando exposta aos extratos de hexano (I) de *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088), metanol (II) de *Oscillatoria limosa* (SAG 42.87), diclorometano:metanol (I)/ metanol (I) de *Arthrospira platensis* (SAG 85.79) e diclorometano:metanol (I)/(II) de *Nostoc* sp. (LMECYA 330). Pelo teste da Microdiluição verificou-se que o extrato metanólico (I) de *A. platensis* (SAG 85.79), a 25% v/v, inibiu totalmente o crescimento de *P. aeruginosa*. Adicionalmente, analisou-se a atividade adjuvante destes extratos em antibióticos de referência para a *P. aeruginosa* e observou-se que todos potenciaram a atividade de aztreonam e piperacilina/tazobactam, excetuando o extrato de diclorometano:metanol (I) de *A. platensis* (SAG 85.79) que apenas potenciou a atividade de aztreonam. O extrato de diclorometano:metanol (I) de *Nostoc* sp. (LMECYA 330) apresentou também atividade sinérgica com o ertapenem.

Os resultados obtidos neste estudo permitiram identificar quatro estirpes cianobacterianas como potenciais fontes de compostos antibacterianos, o que pode contribuir para a mitigação do fenômeno da resistência a antibióticos.

Palavras-chave: resistência a antibióticos, compostos bioativos naturais, cianobactérias, atividade antibacteriana, adjuvantes

## Índice

Agradecimentos .....	i
Abstract .....	ii
Resumo .....	iii
Lista de figuras .....	vi
Lista de tabelas .....	vii
Lista de abreviaturas .....	viii
1 Introdução.....	1
1.1 Antibióticos .....	1
1.2 Resistência a antibióticos .....	4
1.3 Pesquisa de novos antibióticos .....	10
1.4 Cianobactérias .....	13
2 Objetivos .....	21
3 Materiais e Métodos .....	22
3.1 Reagentes e cuidados a ter na sua utilização.....	22
3.2 Estirpes de bactérias patogénicas .....	22
3.3 Estirpes de cianobactérias: origem e condições de cultura .....	23
3.4 Preparação dos extratos cianobacterianos .....	26
3.4.1 Produção de biomassa .....	26
3.4.2 Extração dos compostos da biomassa com solventes .....	27
3.5 Avaliação da toxicidade do DMSO usado na dissolução dos extratos cianobacterianos.....	28
3.6 Avaliação do efeito dos extratos cianobacterianos no crescimento de bactérias patogénicas	29
3.7 Determinação da Concentração Inibitória Mínima dos extratos de cianobactérias .....	29
3.7.1 Inoculação em placas de gelose simples .....	31
3.7.2 Observação ao microscópio ótico a 400x e a 1000x .....	31
3.8 Avaliação da atividade adjuvante de extratos cianobacterianos.....	31
4 Resultados.....	33
4.1 Produção e extração da biomassa das estirpes cianobacterianas .....	33
4.2 Avaliação da toxicidade do DMSO .....	34
4.3 Efeito antibacteriano dos extratos de cianobactérias .....	34
4.4 Concentração Inibitória Mínima dos extratos cianobacterianos.....	37
4.5 Análise da atividade adjuvante dos extratos de cianobactérias .....	41
5 Discussão.....	43
5.1 Produção e extração da biomassa das estirpes de cianobactérias .....	43
5.2 Atividade antibacteriana dos extratos cianobacterianos .....	45

5.3	Atividade adjuvante dos extratos cianobacterianos .....	47
6	Conclusões e Perspetivas Futuras .....	49
7	Referências Bibliográficas.....	50
8	Anexos.....	59
	Anexo I.....	59
	Anexo II .....	61
	Anexo III .....	62
	Anexo IV .....	64
	Anexo V .....	65
	Anexo VI.....	68
	Anexo VII.....	72

## Lista de figuras

<b>Figura 1.1</b> - Principais classes de antibióticos e sua origem. ....	2
<b>Figura 1.2</b> - Vias de transferência horizontal de material genético. ....	5
<b>Figura 1.3</b> - Processo de pesquisa de compostos antibacterianos naturais. ....	11
<b>Figura 1.4</b> - Exemplos de <i>blooms</i> de cianobactérias. ....	15
<b>Figura 1.5</b> - Aplicações das cianobactérias na biotecnologia. ....	16
<b>Figura 3.1</b> - Estirpes de cianobactérias estudadas, pertencentes à coleção ESSACC. ....	24
<b>Figura 3.2</b> - Exemplo de culturas de cianobactérias nas instalações da ESSACC. ....	26
<b>Figura 3.3</b> - Acomodação dos balões de cultura de cianobactérias nas instalações da coleção ESSACC. ....	26
<b>Figura 3.4</b> - Esquema da placa para avaliação do efeito dos extratos das cianobactérias no crescimento das bactérias (esq.) e placa exemplificativa do teste em <i>Escherichia coli</i> NCTC 13846 (dta.). ....	29
<b>Figura 3.5</b> - Esquema da microplaca usada para determinação do valor da CIM dos extratos. ....	30
<b>Figura 4.1</b> - Decantação da biomassa das estirpes cianobacterianas <i>Nostoc commune</i> (LMECYA 291) e <i>Dolichospermum flos-aquae</i> (LMECYA 165). ....	33
<b>Figura 4.2</b> - Avaliação do efeito de diferentes concentrações do DMSO (100, 60, 30, 15, 7,5 e 3,75%) no crescimento de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853. ....	34
<b>Figura 4.3</b> - Avaliação do efeito de extratos cianobacterianos na estirpe <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853. ....	36
<b>Figura 4.4</b> - Controlo do inóculo (A) e controlo da esterilidade do crescimento (B) em placas de meio MHA, no ensaio da microdiluição em <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853. ....	37
<b>Figura 4.5</b> - Determinação da CIM dos extratos cianobacterianos E1, E2, E3, E4, E5 e E6 em <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 pelo método da microdiluição. ....	38
<b>Figura 4.6</b> - Placas de Petri com meio gelose simples inoculadas com alíquotas dos poços 1-3 com os extratos E1, E2, E3, E4, E5 e E6, das microplacas usadas no teste de determinação da CIM em <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853. ....	40
<b>Figura 4.7</b> - Placas quadradas de meio MHA inoculadas com alíquotas dos poços 1-3 com os extratos E1, E2, E3, E4, E5 e E6. ....	40

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1.1</b> - Classes, modos de ação, tipo e espectro de atividade dos principais antibióticos usados na antibioterapia. ....	3
<b>Tabela 1.2</b> - Mecanismos de resistência a antibióticos apresentados por bactérias. ....	6
<b>Tabela 1.3</b> - Lista das bactérias multirresistentes patogênicas prioritárias na investigação e no desenvolvimento de novos antibióticos.....	9
<b>Tabela 1.4</b> - Atividade antibacteriana reportada em cianobactérias:.....	18
<b>Tabela 3.1</b> - Reagentes usados no estudo. ....	22
<b>Tabela 3.2</b> - Estirpes de bactérias patogênicas avaliadas. ....	23
<b>Tabela 3.3</b> - Estirpes de cianobactérias analisadas e respectiva origem. ....	25
<b>Tabela 4.1</b> – Extratos cianobacterianos que induziram inibição do crescimento de bactérias patogênicas e respectivos halos de inibição. ....	35
<b>Tabela 4.2</b> - Resultados da análise da atividade adjuvante de 6 extratos cianobacterianos (E1, E2, E3, E4, E5 e E6) em 16 antibióticos de referência para a estirpe <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853. ....	41

## Lista de abreviaturas

**ADN** – Ácido desoxirribonucleico

**ATCC** – Código das estirpes de bactérias da coleção de culturas “*American Type Culture Collection*”

**AZT** – Aztreonam

**CIIMAR** – Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental

**CIM** – Concentração Inibitória Mínima

**CO<sub>2</sub>** – Dióxido de carbono

**DDI** – Departamento de Doenças Infecciosas

**DMSO** – Dimetilsulfóxido

**EGM** – Elementos genéticos móveis

**ERT** – Ertapenem

**ESKAPE** – Famílias de bactérias Gram negativas “*Enterococcus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella spp.*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp.*”

**ESSACC** – Coleção de Culturas de Algas Estela Sousa e Silva (“*Estela Sousa e Silva Algae Culture Collection*”)

**EUCAST** – Comité Europeu de Avaliação de Suscetibilidade Antimicrobiana (“*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Test*”)

**g** – Grama

**GRA** – Genes de resistência a antibióticos

**h** – Hora

**INSA** – Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

**L** – litro

**LEGE** – Código das estirpes de cianobactérias da coleção de culturas “*Blue Biotechnology and Ecotoxicology*”

**LMECYA** – Código das estirpes de cianobactérias da coleção ESSACC

**LNR-RA/IACS** – Laboratório Nacional de Referência da Resistência aos Antibióticos e Infecções Associadas aos Cuidados de Saúde

**m<sup>2</sup>** – Metro quadrado

**MDR** – Bactérias multirresistentes (“*multidrug resistant bacteria*”)

**mg** – Miligrama

**MHA** – Meio *Mueller-Hinton* sólido (“*Mueller-Hinton Agar*”)

**MHB** – Meio *Mueller-Hinton* líquido (“*Mueller-Hinton Broth*”)

**MIB** – 2-methilisoborneol

**min** – Minuto

**mL** – Mililitro

**mm** – Milímetro

**mol** – Mole

**MRA** – Mecanismos de resistência a antibióticos

**NCTC** – Código das estirpes de bactérias da coleção de culturas “*National Collection of Type Cultures*”

**O<sub>2</sub>** – Oxigênio

**OMS** – Organização Mundial de Saúde

**PDR** – Bactérias resistentes a todas as classes de antibióticos (“*Pan-drug resistant bacteria*”)

**PIP** – Piperaciclina

**PP** – Polipropileno

**s** – Segundo

**SAG** – Código das estirpes de cianobactérias da coleção de culturas “*Sammlung von Algenkulturen*”

**SFE** – Extração por fluídos supercríticos (“*Supercritical fluid extraction*”)

**TAZ** – Tazobactam

**THG** – Transferência horizontal de genes

**TSA** – Teste de Suscetibilidade aos Antibióticos

**UFC** – Unidade formadora de colônias

**URRA** – Código das estirpes de bactérias do sistema de Vigilância Epidemiológica das Resistência aos Antimicrobianos do LNR-RA/IACS

**XDR** – Bactérias extensivamente resistentes (“*Extremely drug-resistant bacteria*”)

**Ø** – Diâmetro

**°C** – Graus Celsius

**µL** – Microlitro

**µmol** – Micromole

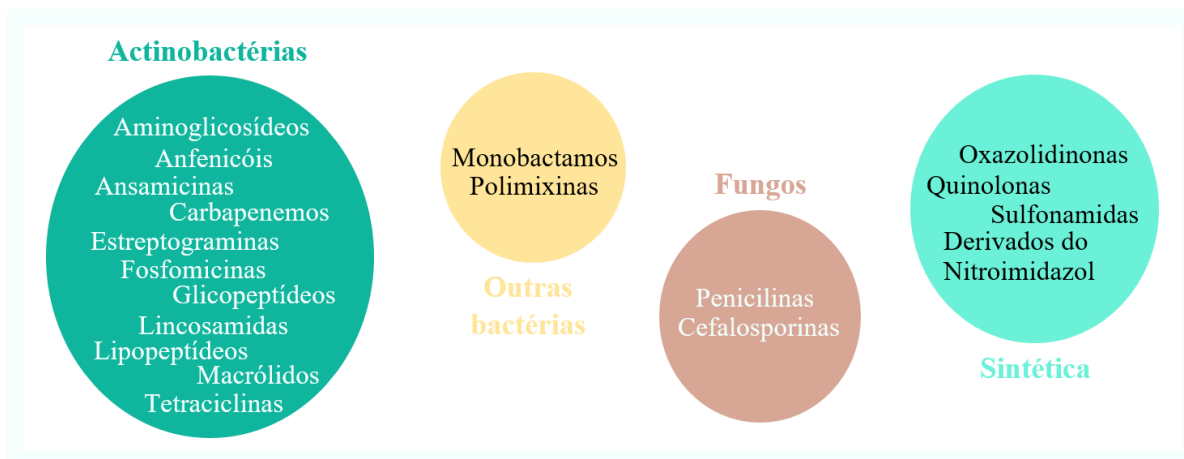
# 1 Introdução

## 1.1 Antibióticos

Os antibióticos foram descobertos na primeira metade do século XX [1–4]. O desenvolvimento destes farmacoterapêuticos revolucionou drasticamente a medicina humana, na medida em que contribuiu para a melhoria dos cuidados de saúde, impediu a ocorrência de milhões de mortes por doenças infecciosas, e conseqüentemente promoveu o aumento da qualidade e da esperança média de vida [4–11]. A maior parte dos antibióticos utilizados atualmente foram descobertos na “Golden Age” dos antibióticos, entre 1940 e 1960, em organismos ambientais presentes no solo, nomeadamente fungos, bactérias e plantas [1,10–17]. Uns dos primeiros antibióticos a serem encontrados foram a penicilina, sintetizada pelo fungo *Penicillium fungus*, e a estreptomicina, produzida pela bactéria *Streptomyces griseus*, que foram descobertos pelos investigadores Alexander Fleming e Selman Waksman, respetivamente [4,15,18–24]. Efetivamente, o Filo das actinobactérias, evidenciou-se como um dos grupos de organismos mais prolífico na produção de antibióticos naturais [18,20,23,24].

Na fase inicial do seu desenvolvimento, os antibióticos eram considerados compostos naturais sintetizados por determinados microrganismos que pareciam atuar em defesa própria, inibindo o crescimento de outros organismos e neutralizando a ação de compostos tóxicos, presentes no meio envolvente [20,21,25,26]. Todavia, o avanço tecnológico permitiu compreender melhor a síntese e atividade destas moléculas [10,25,27]. Os antibióticos são moléculas complexas que apresentam diferentes grupos funcionais na sua estrutura química, e que parecem ser produzidos no fim do ciclo de vida do microrganismo produtor, não sendo essenciais para seu crescimento [25,27,28]. Como tal, estes compostos são considerados metabolitos secundários, cuja síntese ocorre em resposta a fatores ambientais e interações intra e interespecíficas, com o objetivo de garantir a sobrevivência dos organismos que os produzem [10,25,27]. Deste modo, estes metabolitos especializados auxiliam nas funções fisiológicas e ecológicas desempenhadas pelos organismos produtores, constituindo assim uma vantagem adaptativa [20,25].

Atualmente, existem diferentes classes de antibióticos, que apresentam modos de ação distintos nas células bacterianas [2,4,18,24,29]. No que concerne à origem, estes antibióticos podem ser de origem natural, semissintética ou sintética, e têm como função causar a morte de organismos ou inibir a sua atividade [28]. Os antibióticos de origem semissintética são desenvolvidos a partir da modificação da estrutura química de antibióticos naturais e, por sua vez, os antibióticos de origem sintética são totalmente produzidos laboratorialmente [10,24,29,30]. Nos últimos 30 anos, a maioria dos antibióticos desenvolvidos são semissintéticos e são derivados de classes de antibióticos já existentes [2,13,16,17,24]. As principais classes e subclasses de antibióticos que têm vindo a ser utilizados e a respetiva origem encontram-se representados na Figura 1.1.



**Figura 1.1** - Principais classes de antibióticos e sua origem. Adaptado de [10].

As penicilinas, as cefalosporinas, os carbapenemos e os monobactams são subclasses de antibióticos naturais pertencentes à classe dos  $\beta$ -lactâmicos [2,4,18]. Do mesmo modo, os antibióticos das classes dos aminoglicosídeos, anfencóis, estreptograminas, glicopeptídeos, lincosamidas, lipopeptídeos, macrólidos e tetraciclina e polimixinas são de origem natural [2,4,18,24,29]. Por outro lado, os derivados do nitroimidazol, as oxazolidinonas, as quinolonas e as sulfonamidas representam classes de antibióticos desenvolvidos sinteticamente [2,4,24,29]. Por fim, as ansamicinas e a fosfomicina representam classes de antibióticos naturais mais recentes, descobertas entre os anos 70 e 80 [2,4,24,29].

No que diz respeito à atividade, os antibióticos podem ser bactericidas e causar diretamente a morte da bactéria, podem ser bacteriostáticos e inibir a replicação das bactérias, ou podem ser simultaneamente bactericidas e bacteriostáticos, consoante a concentração do composto antibacteriano no organismo [1,12]. Relativamente à especificidade para as bactérias alvo, existem antibióticos de espectro largo, que podem ser usados contra quase todas as bactérias, e antibióticos de espectro estreito, cuja atividade antibacteriana é específica para uma ou apenas algumas espécies bacterianas [4,6]. Grande parte dos antibióticos é eficaz contra infecções causadas por bactérias Gram positivas e Gram negativas, contudo alguns antibióticos apenas são eficazes contra Gram positivas [4]. Na célula bacteriana, os antibióticos podem atuar através de mecanismos fundamentais ao funcionamento da mesma, através de diferentes modos de ação [2,4,24,29,31], sendo estes:

- Inibição da síntese da parede celular – através da ligação a enzimas e intermediários da síntese;
- Inibição da síntese de proteínas – através da ligação às subunidades 30S ou 50S do ribossoma;
- Interferência na replicação e reparação do ácido desoxirribonucleico (ADN) – através da ligação a enzimas;
- Interferência no metabolismo do ácido fólico;
- Interferência na estrutura da membrana celular – através da ligação à membrana celular [2,4,10,29].

A Tabela 1.1 apresenta informação detalhada sobre as classes de antibióticos acima mencionados e respetivos modos de ação, espectro e tipo de atividade antibacteriana. Na atualidade, a classe de antibióticos mais utilizada na antibioterapia humana é a dos  $\beta$ -lactâmicos [20].

**Tabela 1.1** - Classes, modos de ação, tipo e espectro de atividade dos principais antibióticos usados na antibioterapia. Na coluna “Espectro de atividade”, adiciona-se informação relativa ao do tipo de bactérias para as quais os antibióticos são usados: bactérias Gram positivas (G+) e/ou bactérias Gram negativas (G-). (\*) Classes de antibióticos mais recentes.

Classes de antibióticos	Exemplos de antibióticos	Tipo de atividade	Modos de ação	Espectro de atividade	Referência bibliográfica
Penicilinas	Amoxicilina, Meticilina	Bactericida	Inibição da síntese da parede celular	Largo (G+/G-)	[2,4,10,18,24]
Cefalosporinas	Ceftazidima, Cefepima	Bactericida	Inibição da síntese da parede celular	Largo (G+/G-)	[2,4,10,18]
Carbapenemos	Meropenem, Imipenem	Bactericida	Inibição da síntese da parede celular	Largo (G-)	[2,4,10]
Monobactamos	Aztreonam	Bactericida	Inibição da síntese da parede celular	Estreito (G-)	[4,10]
Aminoglicosídeos	Gentamicina, Estreptomicina	Bactericida	Inibição da síntese de proteínas	Largo (G+/G-)	[4,10,18]
Anfenicóis	Cloranfenicol	Bacteriostático	Inibição da síntese de proteínas	Largo (G+)	[2,4,10,24]
Derivados do Nitroimidazol	Metronidazol	Bactericida	Interferência na replicação e reparação do ADN	Largo (G+/G-)	[4]
Estreptograminas	Virginamicina, Pristinamicina	Bacteriostático /Bactericida	Inibição da síntese de proteínas	Largo (G+)	[10,24]
Glicopeptídeos	Vancomicina	Bactericida	Inibição da síntese da parede celular	Estreito (G+)	[2,4,10,18,24]
Lincosamidas	Clindamicina, Lincomicina	Bacteriostático /Bactericida	Inibição da síntese de proteínas	Estreito (G+)	[4,10]
Lipopeptídeos	Daptomicina	Bactericida	Interferência na estrutura da membrana celular	Largo (G+)	[2,4,10,18]
Macrólidos	Eritromicina, Claritromicina	Bacteriostático /Bactericida	Inibição da síntese de proteínas	Estreito (G+)	[2,4,10,18,24, 29]
Oxazolidinonas	Linezolida, Tedizolida	Bactericida	Inibição da síntese de proteínas	Largo (G+)	[2,4,24]
Polimixinas	Colistina	Bactericida	Interferência na estrutura da membrana celular	Estreito (G-)	[2,4,10,24,29]
Quinolonas	Ciprofloxacina, Levofloxacina	Bactericida	Interferência na replicação e reparação do ADN	Largo (G-)	[4,24,29]
Sulfonamidas	Mafenida, Sulfametizol	Bacteriostático	Interferência no metabolismo do ácido fólico	Largo (G+/G-)	[2,24,29]
Tetraciclinas	Doxiciclina, Tigeciclina	Bacteriostático	Inibição da síntese de proteínas	Largo (G+/G-)	[2,4,10,18,24]
Ansamicinas*	Rifamicina	Bactericida	Interferência na replicação e reparação do ADN	Largo (G+/G-)	[2,10]
Fosfomicina*	Fosfomicina	Bactericida	Inibição da síntese da parede celular	Largo (G+/G-)	[24]

Para além da descoberta dos antibióticos ter revolucionado o tratamento das doenças causadas por agentes infecciosos e ter possibilitado a sobrevivência de milhões de pessoas [16,32–34], o desenvolvimento e utilização de compostos antibacterianos também promoveu a melhoria dos cuidados de saúde, na medida em que contribuiu para o aperfeiçoamento de múltiplos procedimentos médicos, tais como cirurgias, transplantes de órgãos, quimioterapia e tratamentos associados a doenças crónicas [2,4,9,11,18,22,35,36]. Atualmente, os antibióticos são amplamente usados não só na medicina humana, mas também na medicina veterinária, agropecuária, agricultura e aquacultura [16,27,34]. Nestas áreas, os antibióticos são usados para fins profiláticos, como forma de prevenção no aparecimento de doenças infecciosas, e como fatores promotores do crescimento de organismos [23,37–39].

## 1.2 Resistência a antibióticos

Apesar do seu êxito nas várias áreas referidas, a eficácia de antibióticos utilizados no combate a doenças infecciosas tem vindo a ser comprometida devido ao aparecimento e disseminação de estirpes bacterianas resistentes a antibióticos [2,9,15,40]. Na natureza, para além dos microrganismos produtores de antibióticos, alguns microrganismos ambientais não produtores de antibióticos e microrganismos patogénicos<sup>1</sup> apresentam um conjunto de genes de resistência a antibióticos (GRA) [18]. Os organismos produtores parecem possuir GRA contra os antibióticos que produzem, de modo a salvaguardarem-se da sua toxicidade, o que representa um fenómeno intrínseco de resistência a antibióticos [21,22]. De semelhante modo, organismos não produtores, tais como as bactérias patogénicas, têm desenvolvido estratégias biológicas de resistência à ação de compostos antibacterianos presentes no meio ambiente, para garantirem a sua sobrevivência [29,41,42]. Estas estratégias adaptativas apresentadas por estirpes bacterianas são denominadas de mecanismos de resistência a antibióticos (MRA) e constituem um processo evolutivo natural, que pode ocorrer em resposta a fatores ambientais diversos [29,41,42].

A nível celular, os MRA podem surgir através de mutações em genes cromossómicos, e como tal serem inatos ao organismo [18,39,43]. Além disso, os MRA podem também resultar da ocorrência do processo de transferência horizontal de genes (THG), e conferir resistência a bactérias comensais presentes na microbiota humana e animal [18,20,31,34,44,45]. Por outro lado, ao nível da comunidade, a resistência a antibióticos pode ser adquirida através da transição de uma célula bacteriana, na sua forma livre, para uma comunidade bacteriana estratificada [29,39,41,43]. Esta associação de células bacterianas encontra-se envolta numa matriz de polissacáridos, proteínas e ADN extracelular por ela produzida, formando um biofilme [29,32,41,46].

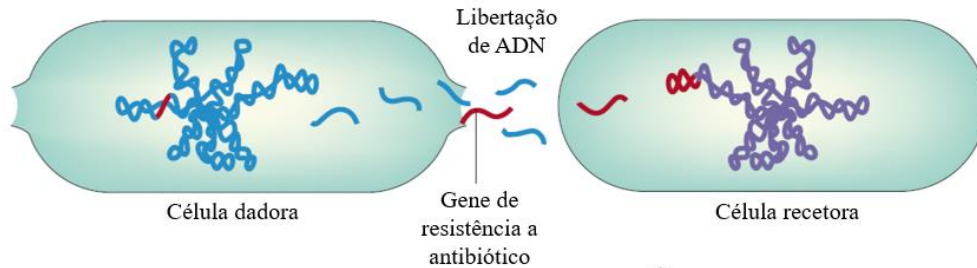
A presença de GRA em elementos genéticos móveis (EGM) existentes no meio ambiente, nomeadamente plasmídeos, bacteriófagos e transposões, [18,22,29,31,38,41,43], e sua disseminação pelas comunidades bacterianas através da THG, promove a ocorrência do fenómeno de resistência a antibióticos [18,22,29,31]. Os EGM são sequências de material genético e proteínas com capacidade de se deslocar no genoma de um organismo ou entre células de organismos diferentes (Figura 1.2), e que funcionam, simultaneamente, como veículos de aquisição e propagação de genes de resistência [20,29,47]. Assim, o processo de transferência horizontal de informação genética, que acontece de uma célula bacteriana para outra, pode ocorrer através de três vias distintas, mediante a presença ou ausência de EGM, sendo estas [18,22,29,31,38,41,43,48]:

---

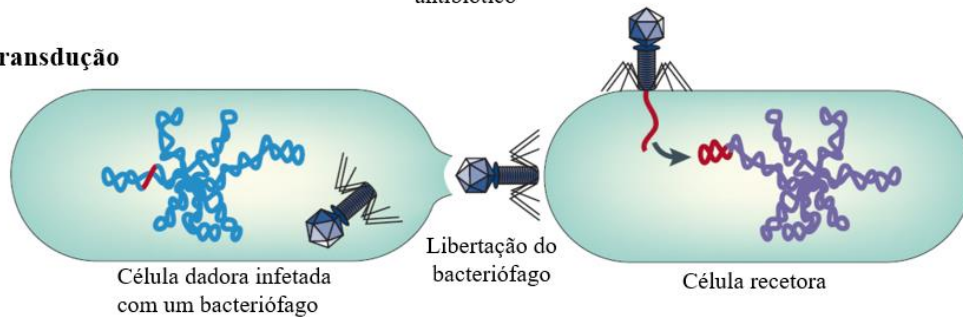
<sup>1</sup> Qualquer agente biológico que cause doença.

- Transformação – Aquisição, por uma célula bacteriana, de material genético presente no meio envolvente proveniente de outra célula;
- Transdução – Passagem, de uma célula bacteriana para outra, de material genético previamente incorporado por um bacteriófago;
- Conjugação – Transferência, de uma célula bacteriana para a outra, de informação genética mediante a presença de um plasmídeo.

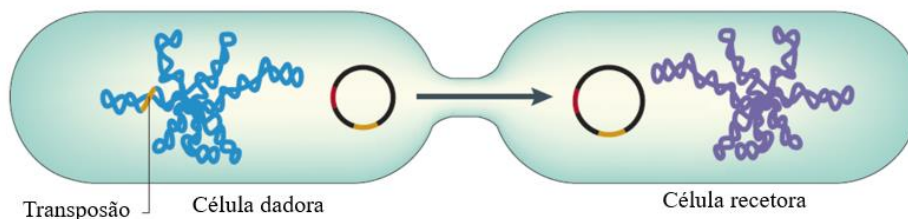
### Transformação



### Transdução



### Conjugação



**Figura 1.2** - Vias de transferência horizontal de material genético. Adaptado de [47].

No entanto, a conjugação mediada por plasmídeos é o processo de transferência genética pelo qual grande parte dos GRA é propagada entre as diferentes espécies de bactérias, pelo facto de ser o mais eficaz [18,41]. Neste processo pode existir transferência de vários GRA em simultâneo [18,41]. Deste modo, a THG possibilita a disseminação e o desenvolvimento de diferentes MRA nas bactérias, que podem ou não ocorrer simultaneamente [1,29]. Os principais MRA desenvolvidos pelas bactérias encontram-se descritos na Tabela 1.2.

**Tabela 1.2** - Mecanismos de resistência a antibióticos apresentados por bactérias.

Mecanismo de resistência a antibióticos		Referência bibliográfica
Inativação enzimática do antibiótico	Produção de enzimas que hidrolisam ou inativam o antibiótico.	[2,18,22,29,41]
Alteração do local de ação do antibiótico	Interferência ou alteração do local de ligação do antibiótico, diminuindo ou anulando a afinidade do mesmo.	[2,18,22,29,41]
Alteração da permeabilidade da membrana celular	Redução da permeabilidade da membrana, pela modificação da sua estrutura ao nível das proteínas responsáveis pela passagem do antibiótico.	[2,18,22,29,41]
Ativação de bombas de efluxo	Ativação de bombas de efluxo, proteínas presentes na membrana celular, responsáveis pela remoção do antibiótico do interior da célula, transportando-o do meio intracelular para o meio extracelular.	[2,18,22,29,41]

Na natureza existe um *pool* de GRA e de EGM [20,21,27,31]. Em conjunto com as bactérias resistentes a antibióticos, estes constituem o resistoma ambiental [20,21,27,31]. Numa comunidade bacteriana, a transferência de GRA entre os microrganismos, através da THG, é um processo evolutivo que lhes confere capacidades de adaptação e colonização de novos nichos, pelo desenvolvimento de MRA [20,31]. Neste contexto, a resistência a antibióticos é um fenómeno natural de evolução apresentado pelas bactérias [2,27,31]. Contudo, na atualidade, a ocorrência de novos GRA em populações bacterianas não se deve apenas a fatores ambientais de adaptabilidade e dispersão [18].

Em ecossistemas naturais, organismos resistentes a antibióticos e organismos sensíveis a antibióticos coexistem e beneficiam-se mutuamente na presença de concentrações baixas de múltiplos compostos antibacterianos [20,22]. Todavia, nas últimas décadas, o uso exacerbado de antibióticos em diferentes setores conduziu à acumulação destes compostos no meio ambiente e à emergência de um fenómeno de pressão seletiva [1,8,9,18,20,31,38]. A constante exposição das bactérias a diferentes concentrações de antibióticos desencadeou a emergência de um fenómeno de seleção ambiental de bactérias resistentes a antibióticos [1,8,18,29,37], através da transferência horizontal de GRA de organismos produtores para bactérias comensais e patogénicas, existentes nas populações bacterianas [18,31,34,44,45]. Desta forma, determinados grupos de bactérias resistentes a antibióticos têm vindo a ser selecionados durante o processo evolutivo [6,33,34,49].

No meio ambiente, existem reservatórios de GRA e EGM onde diferentes populações e comunidades bacterianas interagem entre si, na presença de concentrações subinibitórias de antibióticos e de compostos químicos gerados por atividades antropogénicas, tais como metais pesados e nanomateriais, que podem ser igualmente indutores de fenómenos de pressão seletiva [9,18,20,22,31,45]. Esses reservatórios são considerados reatores genéticos pelo facto de propiciarem a emergência de fenómenos de resistência a antibióticos em bactérias [20,23,35,38,39,45]. Nos reatores genéticos ocorre troca genética entre espécies bacterianas ambientais e estirpes bacterianas clínicas, que podem ou não ser patogénicas [11,18,20–22]. Posto isto, os principais reatores genéticos promotores de resistência a antibióticos nas bactérias são [16,17,23,27,37–39,45]:

- O Microbioma humano e animal, que são constituídos por diferentes populações de bactérias;

- Resíduos biológicos provenientes da medicina humana e veterinária, indústria farmacêutica, agropecuária, agricultura e aquacultura;
- Efluentes de estações de tratamento de água;
- Solo e ambientes aquáticos.

Os ecossistemas aquáticos são os principais locais de transferência de GRA [20,31]. Nestes locais, os resíduos de antibióticos libertados pelos setores acima mencionados resistem a processos de biodegradação [20,31]. A presença destes compostos, mesmo que em concentrações baixas, pode ter consequências nefastas em organismos aquáticos, tais como peixes, principalmente durante períodos longos de exposição [20,27,31,50].

Como já foi mencionado, o uso exacerbado de antibióticos, principalmente como profilaxia, foi o fator determinante no aparecimento da resistência a antibióticos [7,17,49]. A nível clínico, a administração de quantidades elevadas de antibióticos e de vários antibióticos simultaneamente no tratamento de infecções bacterianas, de forma a prolongar a eficácia da terapêutica [12,21,27,29,37,38,51], o uso inadequado de antibióticos em doenças não causadas por bactérias e ainda a indisponibilidade de ferramentas de avaliação e diagnóstico apropriados, também contribuíram para o desenvolvimento desse fenómeno [2,4,8,27,29,40]. Por outro lado, a desinformação acerca do uso de antibióticos, o acesso a antibióticos sem prescrição médica e a automedicação por parte da população foram também fatores decisivos [4,8,21,24,35,37,52,53]. Contudo, neste cenário da resistência a antibióticos, o mais alarmante é o insucesso da indústria farmacêutica na descoberta e produção de novos antibióticos, apesar do investimento no processo de desenvolvimento de fármacos [2,15,21,51,54].

Assim, as bactérias têm desenvolvido, à escala global e de forma contínua, mecanismos e sistemas de adaptação a vários compostos antibacterianos [7,17,55,56]. O fenómeno de resistência a antibióticos representa um dos principais e mais urgentes problemas de saúde pública do século XXI [1,10,11,15,19,36,57], com consequências ao nível clínico, económico e social [5,8,32,46,53,58].

Devido à disseminação da resistência a antibióticos, as taxas de morbidade e mortalidade têm vindo a aumentar, sobretudo na população suscetível [1,4,8,46,53,59–61]. Anualmente, ocorrem mais de 700 000 mortes por doenças infecciosas causadas por bactérias resistentes [1,4,8,59], tendo sido já estimado que este número pode aumentar para 10 milhões em 2050 [7,10,20,31,32,37,39,43]. Em contexto clínico, para além de frequentemente causarem infecções nosocomiais, isto é, adquiridas no hospital, e estarem associadas à administração de doses elevadas de antibióticos e ao prolongamento da estadia do paciente, o que tem custos associados [29,37,43,53,60,61], a presença de estirpes bacterianas resistentes a antibióticos pode impossibilitar a realização de procedimentos hospitalares [37,39]. Adicionalmente, estas bactérias têm-se mostrado cada vez mais resistentes a antibióticos da classe dos carbapenemos, considerados “antibióticos de última linha” por serem os mais eficazes no tratamento de infecções causadas por estirpes multirresistentes, o que tem sido alarmante [1,4,8,59]. A nível económico, a iminente crise de antibióticos pode vir a agravar o contexto atual de pobreza mundial [1,8,29,37,39,59].

Ainda a nível clínico, com a alteração gradual da composição e do tipo de populações presentes nos ecossistemas tem-se verificado o aumento do número de bactérias patogénicas multirresistentes a um ou mais antibióticos e da virulência<sup>2</sup> de algumas estirpes bacterianas [5,20,21,27,31,46,62]. Deste modo, clinicamente as bactérias multirresistentes são divididas, de

---

<sup>2</sup> Capacidade do agente biológico em produzir efeitos graves ou fatais quando provoca doença.

acordo com o grau de resistência que apresentam, isto é, consoante o número de antibióticos a que são resistentes, em [4,15,18,52,61,63]:

- Bactérias multirresistentes (*multidrug resistant*, MDR) – resistentes a pelo menos um antibiótico de três classes de antibióticos diferentes;
- Bactérias extensivamente resistentes (*extremely drug-resistant*, XDR) – resistentes a quase todas as classes de antibióticos;
- Bactérias pan-resistentes (*pan-drug resistant*, PDR) – resistentes a todas as classes de antibióticos.

Em ambiente hospitalar, o número de bactérias resistentes dos tipos MDR e XDR tem vindo a aumentar exponencialmente [32,52]. Atendendo a todo o cenário da resistência a antibióticos, o aparecimento e a disseminação de bactérias multirresistentes a várias classes de antibióticos apresenta-se como uma questão crítica, já que para a maior parte delas não existe tratamento [8].

Em 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) apresentou uma lista das principais bactérias multirresistentes a antibióticos que são responsáveis pela emergência de doenças infecciosas severas e que, como tal, apresentam risco para a saúde humana [15,54,63,64]. Esta lista foi elaborada com o propósito de priorizar a pesquisa e o desenvolvimento de estratégias de produção de antibióticos que sejam eficazes no tratamento das mesmas de acordo com diferentes critérios, tais como a prevalência de resistência, disponibilidade de tratamento e mortalidade associada [2,11,15,64,65]. Assim sendo, estas bactérias multirresistentes patogénicas foram agrupadas em três categorias, crítica, elevada e média, conforme o nível de prioridade para investigação e desenvolvimento de novos antibióticos [2,32,66] e são apresentadas na Tabela 1.3.

**Tabela 1.3** - Lista das bactérias multirresistentes patogênicas prioritárias na investigação e no desenvolvimento de novos antibióticos. Esta lista foi criada pela OMS e inclui 12 famílias de bactérias. (\*) A família Enterobacteriaceae inclui: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp. e *Morganella* spp. Adaptado de [15,64].

	Família de bactérias	Resistente a
Prioridade 1: Crítica	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Carbapenemos
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Carbapenemos
	<i>Enterobacteriaceae*</i>	Carbapenemos e cefalosporinas
Prioridade 2: Elevada	<i>Enterococcus faecium</i>	Vancomicina
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Meticilina e vancomicina
	<i>Helicobacter pylori</i>	Claritromicina
	<i>Campylobacter</i>	Fluoroquinolonas
	<i>Salmonella</i> spp.	Fluoroquinolonas
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Cefalosporinas e fluoroquinolonas
Prioridade 3: Média	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Penicilina
	<i>Haemophilus influenzae</i>	Ampicilina
	<i>Shigella</i> spp.	Fluoroquinolonas

Estas bactérias patogênicas são resistentes a vários antibióticos [2,63]. A criação desta lista pela OMS evidenciou a existência de um conjunto de bactérias associadas ao aparecimento e propagação de determinadas infecções nosocomiais de difícil tratamento, e desta forma particularmente preocupantes [2,20,21,41,63]. Estas espécies bacterianas são *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* spp., *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp. (ESKAPE) [20,21,41,63]. As bactérias ESKAPE são Gram negativas e multirresistentes [2,11].

A pesquisa e o desenvolvimento de novos antibióticos seria a solução ideal para combater o avanço da resistência a antibióticos, no entanto poucas ou nenhuma novas classes de antibióticos foram desenvolvidas nas últimas décadas, o que se deve principalmente ao facto de os antibióticos em desenvolvimento não reunirem as condições farmacológicas e biológicas pretendidas [16,17,45,46,51]. Porém, existem algumas soluções mais imediatas, que podem contribuir para a mitigar o fenómeno da resistência a antibióticos [1,12,24,41,51]. Deste modo, efetuar a prescrição e administração racional de antibióticos em contexto terapêutico, isto é, evitar a administrações de doses de antibióticos maiores do que o suposto e a prescrição de antibióticos de largo espetro, bem como recorrer a terapias alternativas, tais como a aplicação de bacteriófagos e probióticos na indústria alimentar e farmacêutica, são estratégias cuja utilização pode atenuar o cenário da resistência a antibióticos [8,12,24,27,67].

O desenvolvimento de compostos antibiofilme que possam interferir na estrutura do biofilme, impedindo a adesão das bactérias e, portanto, diminuindo a capacidade das bactérias produtoras de biofilme de subsistir no meio ambiente e propagar GRA e MRA, também pode ser uma boa opção de mitigação [1,20,24,41]. A monitorização da libertação de resíduos de compostos antibacterianos para o meio ambiente também pode ser crucial na atenuação da ocorrência e dispersão de GRA e MRA [13,22,31]. Por outro lado, considerar a multiterapia, ou seja, a combinação entre antibióticos pertencentes à mesma classe ou a associação entre antibióticos e outros compostos com propriedades antibacterianas, tais como os compostos adjuvantes de antibióticos, pode ser uma forma de prevenir a

emergência de novas estirpes resistentes a antibióticos e, conseqüentemente mitigar o cenário de resistência a antibióticos [1,12,15,22,51]

Os adjuvantes são compostos naturais que, apesar de não terem atividade antibacteriana comprovada, quando combinados com antibióticos intensificam as suas propriedades, nomeadamente a atividade bactericida e bacteriostática, podendo aumentar a eficácia destes antimicrobianos [1,25,37,51]. Os tipos de adjuvantes conhecidos incluem inibidores das  $\beta$ -lactamases, inibidores de bombas de efluxo e estimuladores da permeabilidade da membrana [2,51]. Desta forma, os adjuvantes dos antibióticos podem interagir com os antibióticos, afetar os MRA desenvolvidos pelas bactérias, prolongar a longevidade dos antibióticos e minimizar o fenómeno de resistência aos mesmos [2,37,51]. O ácido clavulânico, o sulbactam e o tazobactam são exemplos de adjuvantes de antibióticos utilizados na antibioterapia moderna [2].

### 1.3 Pesquisa de novos antibióticos

Nos últimos tempos, apenas um número reduzido de novas classes de antibióticos foi desenvolvido, apesar da urgência de combater o cenário atual da disseminação de estirpes multirresistentes e, como tal, de produzir novos antibióticos [9,15,16,21,22]. Desde a descoberta do primeiro antibiótico natural, a penicilina, que começou a ser investigada a presença de outros compostos com propriedades antibacterianas noutros microrganismos e, desta forma, foram identificadas mais moléculas químicas que se tornaram antibióticos naturais ou serviram para a produção de novos antibióticos [4,15,18–22,68]. Na atualidade, a maior parte dos antibióticos utilizados deriva de compostos naturais, isolados de microrganismos há algumas décadas atrás [67].

A maioria dos antibióticos existentes são semissintéticos, ou seja, foram desenvolvidos através da alteração e modificação de compostos antibacterianos naturais [12,30,65] e, conseqüentemente, atuam contra mecanismos de resistência específicos [4,11,15,23,54]. A modificação química dos antibióticos naturais existentes permitiu a diminuição da toxicidade biológica que frequentemente apresentavam, a estabilização da estrutura química e, portanto a melhoria da sua eficácia [21,24]. Por seu turno, o desenvolvimento de antibióticos sintéticos em contexto laboratorial permitiu não só a introdução de novas moléculas na antibioterapia, como também possibilitou a otimização da produção de antibióticos a uma escala industrial [10,21,24,29]. Apesar do desenvolvimento de versões semissintéticas de antibióticos se apresentar como uma solução às limitações encontradas na antibioterapia, os antibióticos semissintéticos favorecem o aparecimento de fenómenos de multirresistência, na medida em que os modos de ação sobre as bactérias permanecem os mesmos [12,54].

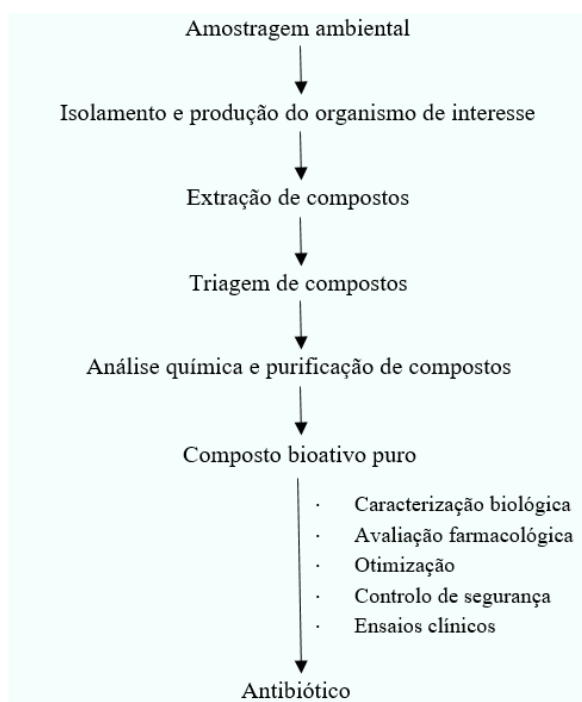
Deste modo, é fundamental e urgente investir na descoberta de novos compostos antibacterianos que ultrapassem todas as limitações encontradas [21,24,67] Assim, durante o processo de desenvolvimento de antibióticos, devem ser explorados compostos que consigam [2,4,8,41,51,59]:

- Impedir de forma eficaz o crescimento do agente patogénico e a proliferação dos respetivos mecanismos de resistência;
- Atuar especificamente em processos vitais do agente patogénico, sem prejudicar e desequilibrar as populações bacterianas comensais presentes no organismo humano;
- Apresentar pouca ou nenhuma toxicidade sobre os restantes processos fisiológicos do organismo humano;

- Possuir modos de ação diferentes dos antibióticos existentes, de modo a evitar os mecanismos de resistência presentes nas bactérias;
- Exercer baixa pressão seletiva no meio ambiente.

Tal como já foi referido no ponto 1.1, os primeiros microrganismos a ser estudados como fontes naturais de antibióticos foram fungos, bactérias e, em particular, organismos presentes no solo [18,20,23,25,67]. Os compostos naturais são conhecidos por apresentarem uma variedade de propriedades antimicrobianas [16,17,69]. Estes são metabolitos especializados que auxiliam o organismo produtor no desempenho das suas funções fisiológicas e ambientais [25]. O aparecimento de novas doenças infecciosas causadas por bactérias e a crescente evolução dos agentes patogénicos multirresistentes vieram intensificar a pesquisa de novos compostos antibacterianos na natureza, não só em grupos de organismos conhecidos pela sua produção, mas também em grupos de organismos diferentes [1,10,25,63,70,71].

Atualmente, a pesquisa de novas moléculas naturais com propriedades antibacterianas contra determinados microrganismos tem sido intensificada em organismos que não os tradicionais, tais como plantas, macroalgas e microalgas [6,14,17,40,63,71,72], uma vez que estes organismos constituem uma fonte vasta de metabolitos ativos com propriedades antimicrobianas [10,70–72]. Essencialmente, o processo tradicional de pesquisa de compostos antibacterianos naturais consiste no isolamento dos compostos bioativos de culturas laboratorialmente produzidas, dos organismos de interesse, e na subsequente avaliação desses compostos quanto à inibição do crescimento de organismos alvo, as bactérias patogénicas [25]. Este procedimento compreende as fases esquematizadas na Figura 1.3.



**Figura 1.3** - Processo de pesquisa de compostos antibacterianos naturais. Adaptado de [68].

Algumas plantas produzem metabolitos secundários em resposta a fatores bióticos e abióticos adversos, alguns dos quais com comprovada eficácia no tratamento de infeções bacterianas [1,70,73]. Por outro lado, extratos vegetais, obtidos a partir de plantas podem ser também usados como

adjuvantes de outros antibióticos [1,70]. Outro grupo de organismos que têm revelado interesse para a pesquisa e desenvolvimento de antibióticos naturais são os organismos marinhos, nomeadamente macroalgas e microalgas [9,68,72,74–76], principalmente pelo facto de existir a possibilidade dos compostos bioativos produzidos por estes organismos serem altamente eficientes por estarem expostos ao efeito de diluição presente no meio aquático e mesmo assim manterem a sua bioatividade [19,68,70,71]. Nos últimos anos, tem sido dada particular atenção à avaliação da produção de moléculas antibacterianas naturais em cianobactérias [19,40,70,72,77].

Inicialmente, a atividade antibacteriana de compostos naturais era principalmente avaliada em bactérias Gram positivas, nomeadamente em *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, em *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Listeria* spp., *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina, *Enterococcus faecalis* e *Clostridium difficile* [25,78,79]. Contudo, mais recentemente os compostos bioativos naturalmente produzidos têm sido principalmente avaliados em bactérias Gram negativas, tais como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* [78,79], tendo sido dada especial atenção às bactérias Gram negativas ESKAPE [78]. A necessidade de criar antibióticos eficazes contra estas bactérias é particularmente urgente, visto que o número de bactérias Gram negativas multirresistentes associadas a doenças infecciosas observadas em contexto clínico é elevado, e os antibióticos que existem não têm sido suficientes para impedir a sua disseminação [2,4,11,37,65,78]. Isto deve-se sobretudo à complexidade da estrutura celular que apresentam, com uma membrana externa constituída por lípidos, e ao desenvolvimento de vários mecanismos celulares de resistência específicos, como por exemplo a diminuição da permeabilidade da membrana externa a compostos antibacterianos [4,11,15,19,37,78].

Apesar de crescente, a pesquisa de compostos antibacterianos naturais apresenta algumas limitações, na medida em que é um trabalho intensivo, dispendioso e pouco rentável [67,68,78,80]. A produção destes compostos em laboratório requer a replicação de todas as condições a que os organismos produtores estão expostos no meio ambiente, de modo a induzir corretamente a síntese dos compostos de interesse, o que nem sempre é conseguido [67,68]. Por outro lado, alguns compostos naturais acabam por não exibir a atividade bacteriana pretendida *in vitro*, e outros podem inclusive apresentar toxicidade significativa [80].

Porém, a exposição das culturas de microrganismos a estímulos específicos, por forma a induzir a produção de determinados compostos em particular, através da alteração de parâmetros químicos e físicos como o pH, a temperatura e a disponibilidade de nutrientes, constitui uma abordagem utilizada para ultrapassar as limitações encontradas no processo de desenvolvimento de compostos antibacterianos a partir de organismos naturais [25,67]. De igual modo, produzir coculturas de diferentes espécies de organismos (por exemplo associações bactérias/fungos) também pode ser uma abordagem de interesse, uma vez que permite identificar novos compostos bioativos resultantes dessa interação e as respostas fisiológicas aos mesmos [25,67]. Presentemente, no processo de desenvolvimento de compostos antibacterianos a partir de organismos naturais têm sido aplicadas com sucesso várias técnicas e procedimentos, tais como a sequenciação de nova geração, ferramentas bioinformáticas e espetrometria de massa [67,78].

#### 1.4 Cianobactérias

As cianobactérias são um grupo de microalgas que surgiu há cerca de 3,5 mil milhões de anos e que apresenta uma longa história evolutiva [9,50,72,81–83]. Estes microrganismos procarióticos fotossintéticos foram dos primeiros a colonizar o planeta, sendo os principais responsáveis pela formação da atmosfera oxigénica que impulsionou o aparecimento de várias formas de vida [76,84–90]. As cianobactérias são um grupo de microrganismos diversificado que representa mais de 70% da comunidade do fitoplâncton e desempenha funções ecológicas essenciais em vários ecossistemas [26,44,76,82,84,91–93]. Taxonomicamente este grupo de microrganismos divide-se em várias ordens, sendo as três mais reconhecidas a Oscillatoriales, Chroococcales e Nostocales [71,76,92,94]. A nível morfológico, as cianobactérias podem ser unicelulares ou coloniais [26,40,58,71,76,81,88,90]. As células podem ser esféricas, em forma de bacilo e elipse [26,91]. Quando formam colónias, as cianobactérias podem estar envoltas numa mucilagem, que é uma estrutura que protege as células contra condições adversas, e apresentar formas diversas, tais como filamentos ou colónias esféricas [76,90–92,94]. A maior parte destes microrganismos são microscópicos, no entanto alguns podem ser visíveis macroscopicamente quando formam colónias e crescem massivamente (*blooms*) [81]).

Algumas estirpes de cianobactérias filamentosas, pertencentes à ordem Nostocales, podem possuir três tipos de células, nomeadamente células vegetativas, heterócitos e acinetos [26,71,76,91]. As células vegetativas são células fotossintéticas cuja formação ocorre em condições favoráveis [26,50,71,76,91]. Os heterócitos e os acinetos, por outro lado, são células especializadas que podem ser desenvolvidas em resposta a fatores ambientais adversos [50,58,88,91]. Os heterócitos são células responsáveis pela fixação de azoto, que são produzidas na presença de níveis de azoto insuficientes [50,58,76,84,88,91]. Por sua vez, os acinetos são células de resistência, capazes de acumular nutrientes de reserva, que subsistem em condições adversas, tais como dessecação, baixas temperaturas, congelação e níveis insuficientes de fósforo [50,58,76,84,88,91]. Quando as condições de desenvolvimento se tornam favoráveis estas células germinam, dando origem a uma nova população de cianobactérias [50,58,76]. Estas células especializadas conferem uma vantagem adaptativa às espécies de cianobactérias desta ordem [50,88,91].

A estrutura e organização celular das cianobactérias é tipicamente procariótica, na medida em que não possuem organelos como núcleo, cloroplastos e mitocôndrias, contrariamente às células eucarióticas [17,50,76,84,90]. No entanto, as células cianobacterianas possuem sistemas fotossintéticos similares aos das algas eucarióticas, e são capazes de realizar respiração celular e fotossíntese [50,76,84]. Isto deve-se ao facto do sistema membranar destes organismos fotoautotróficos conseguir realizar o transporte de eletrões envolvido nos dois processos [17,71,76,81,84,95]. As cianobactérias são os principais organismos fixadores de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), sendo que utilizam estas moléculas para o seu crescimento, produção de biomassa e de oxigénio (O<sub>2</sub>) durante a fotossíntese [45,50,76,84,85,88]. São ainda capazes de fixar azoto atmosférico, através de reações enzimáticas de conversão de azoto atmosférico em formas de azoto biologicamente acessíveis [50,83].

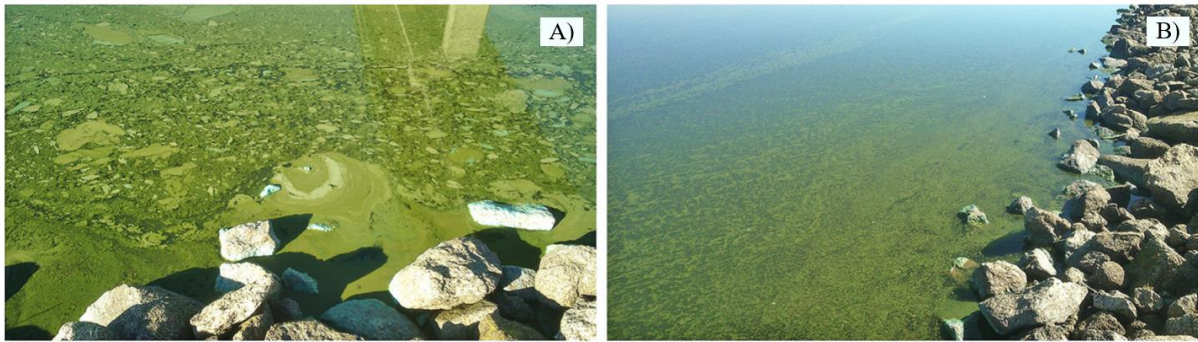
Pelo facto de realizarem fotossíntese e fixação de azoto atmosférico, as cianobactérias desempenham funções ecológicas importantes em vários ecossistemas [26,44,50,76,82,91]. Estes organismos são particularmente essenciais nos ecossistemas aquáticos, locais onde são produtores primários [50,76,82,84,85,91]. Por vezes, as cianobactérias vivem em associações ecológicas mutuamente benéficas com organismos não fotossintéticos, e que podem ser bactérias, fungos ou plantas, fornecendo-lhes carbono ou azoto em troca de nutrientes e proteção contra predadores [9,26,50,76,91]. Além disto, as cianobactérias interferem na dinâmica de algumas populações e comunidades aquáticas, dado que produzem e libertam para o meio ambiente compostos com atividade

alelopática, isto é, que influenciam de forma favorável ou desfavorável o crescimento, desenvolvimento e reprodução de outros organismos [50,83,96]. Estes compostos podem ser fatores de crescimento e promover o desenvolvimento dos organismos hospedeiros ou, por outro lado, auxiliar na defesa contra ataques predatórios [74,82,83].

Geograficamente, as cianobactérias encontram-se distribuídas por várias regiões, que variam de tropicais a áridas, e por diferentes ecossistemas, que podem ser aquáticos e terrestres, o que se deve ao facto de serem bastante eficazes na colonização de variados nichos ecológicos [9,26,40,50,71,86,88,89]. Deste modo, as cianobactérias podem ocupar ambientes marinhos, de água doce, como albufeiras e lagos, pântanos, solos, rochas, montanhas, desertos, e até habitats extremos como fontes hidrotermais, solos vulcânicos e glaciares [9,26,50,81,82,86,88,89,95]. Em ecossistemas aquáticos, existem cianobactérias planctónicas, que ocupam toda a coluna de água, e cianobactérias bênticas, que aderem a superfícies submersas, tais como sedimentos, rochas e plantas aquáticas [50,82,88,91]. A colonização eficaz de diferentes nichos ecológicos pelas cianobactérias deve-se às capacidades de adaptação e aos mecanismos celulares e fisiológicos que possuem [14,26,40,50,72,81,91,95,96].

Assim, as cianobactérias são capazes de se adaptar a qualquer tipo de habitat e condição ambiental, e podem estar expostas a diversos predadores e agentes patogénicos [9,14,26,40,50,71]. Embora apenas necessitem de radiação solar, CO<sub>2</sub>, água e alguns nutrientes para o seu crescimento, este pode ser influenciado por inúmeros fatores ambientais, que podem ser bióticos e abióticos, tais como, pH, stress oxidativo, presença de compostos antibacterianos e de sideróforos (moléculas de origem bacteriana que atuam na captação de ferro) [25,26,71,75,81,88,91]. Estes microrganismos podem tolerar fatores de crescimento limitantes, nomeadamente condições de hipersalinidade, stress osmótico, ausência de azoto e baixa intensidade luminosa [14,26,40,71,81,88,89]. Algumas espécies de cianobactérias bênticas são capazes de crescer em condições heterotróficas, na ausência de luz e oxigénio, e realizar fermentação recorrendo a compostos orgânicos, tal como a glucose, como fonte de carbono [26,58,76,88].

Em ecossistemas aquáticos, na presença de condições favoráveis ao seu crescimento, as cianobactérias crescem exponencialmente e formam *blooms* [26,50,89,91]. Um *bloom* cianobacteriano é detetado pela alteração visível da coloração da água causada pelo crescimento massivo de cianobactérias [85] (Figura 1.4). A formação de *blooms* de cianobactérias tem sido cada vez mais frequente, devido ao aumento da temperatura, dos níveis de CO<sub>2</sub> atmosférico e da eutrofização das massas de água, isto é, a elevada concentração de nutrientes, condições estas que têm sido maioritariamente causadas por atividades antropogénicas e pelas alterações climáticas [58,80,83,89,91,97]. Muitas vezes, a formação de *blooms* pode ter impactos negativos no ecossistema, na medida em que pode conduzir à depleção de O<sub>2</sub> e dos nutrientes disponíveis, dificultar o acesso de radiação solar nas camadas inferiores da coluna de água e, por outro lado, pode estar associada à produção de compostos tóxicos e de compostos com odor e sabor, como as cianotoxinas e a geosmina e o 2-methylisoborneol (MIB), respetivamente [26,58,80,83,89,96]. Estes compostos químicos podem comprometer a qualidade das massas de água e a sua utilização para fins recreativos e de consumo [26,58].



**Figura 1.4** - Exemplos de *blooms* de cianobactérias. Imagens adaptadas de [98].

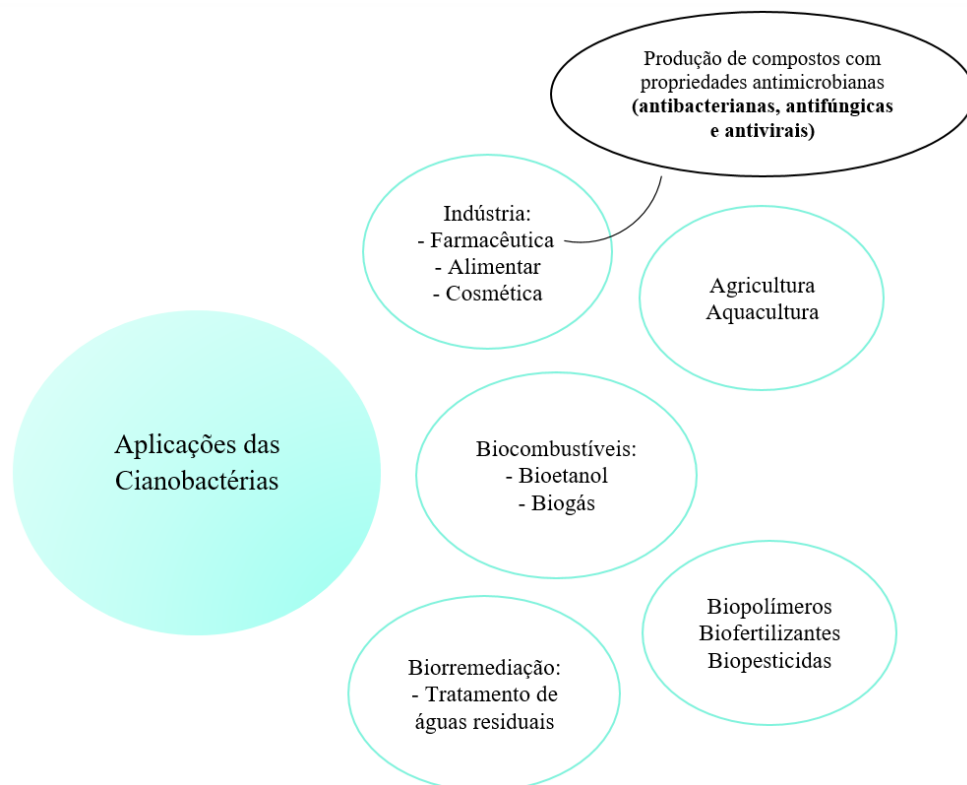
Tanto a geosmina e o MIB como os compostos tóxicos produzidos pelas cianobactérias são considerados metabolitos secundários, uma vez que parecem não estar envolvidos no crescimento, desenvolvimento e reprodução das cianobactérias [50,71]. Segundo alguns autores, estes e outros metabolitos secundários são especificamente sintetizados pelas cianobactérias, em resposta às condições ambientais existentes nos nichos ecológicos que habitam [21,50,71,74,94]. Em particular, os metabolitos secundários cianobacterianos participam nas relações intraespecíficas e interespecíficas que as cianobactérias estabelecem [83,96,99]. A sua segregação pode beneficiar ou prejudicar o desenvolvimento de plantas, invertebrados e vertebrados, mesmo que se encontrem a baixas concentrações [30,74,82,83,96,99]).

As cianotoxinas são um conjunto de metabolitos secundários produzidos por algumas estirpes de cianobactérias, cuja síntese parece funcionar como um mecanismo de proteção contra predadores [58,75,80–82,95]. Todavia, estes metabolitos também podem ser altamente nocivos para outros organismos mais distantes na escala evolutiva, como animais e plantas [85,91,97]. De acordo com o efeito biológico que exercem nos animais, as cianotoxinas podem ser então classificadas em neurotoxinas, hepatotoxinas, citotoxinas e dermatotoxinas [14,71,89]. Alguns exemplos reconhecidos de toxinas destes grupos são as microcistinas, saxitoxinas, anatoxinas e nodularinas, que foram designadas consoante a espécie cianobacteriana de onde foram descobertas [14,71,89]. A produção destas toxinas pode representar um risco para a saúde pública, sobretudo quando as estirpes tóxicas proliferam e formam *blooms* [71,81,91,95]. A exposição a cianotoxinas, aguda ou crónica, pode causar efeitos tóxicos no sistema nervoso, rins, fígado e aparelho gastrointestinal [50,89]. Acresce o facto de que algumas cianotoxinas (microcistinas, nodularina e cilindrospermopsina) são genotóxicas, sendo a microcistina considerada possivelmente cancerígena [84]. Contudo, algumas cianotoxinas podem ser usadas para fins terapêuticos, no desenvolvimento de fármacos e em estudos ecotoxicológicos [26,71,81,82,85,89,95].

A distribuição ubíqua por quase todos os tipos de habitats, a capacidade de proliferação elevada, a atividade fotossintética eficiente e a plasticidade metabólica são algumas das características evidenciadas pelas cianobactérias que podem fundamentar o facto de estes microrganismos constituírem um grupo com elevada diversidade morfológica, bioquímica e fisiológica [14,19,50,71,76,81,95]. Para além disto, todas estas características parecem estar relacionadas com a sua produção de metabolitos secundários com diversas atividades biológicas [80,83,99,100]. A produção destes compostos bioativos e a facilidade de manuseamento e de adaptação das cianobactérias em contexto laboratorial, por requererem condições de crescimento elementares e possuírem uma taxa de crescimento elevada, tornou as cianobactérias um alvo de interesse na produção industrial e biotecnologia [9,40,50,81,88,95]. Atualmente, as cianobactérias têm aplicações biotecnológicas na indústria alimentar e farmacêutica, na agricultura, na aquacultura, na produção de

cosméticos e de biocombustíveis e em processos de biorremediação de poluentes ambientais, como por exemplo no tratamento de águas residuais (Figura 1.5) [9,40,50,58,72,81,82,86,95].

As cianobactérias são utilizadas na produção de suplementos alimentares, que podem vir a ser essenciais para suprimir as exigências nutricionais populacionais decorrentes do cenário das alterações climáticas [50,86]. Por outro lado, a biomassa que produzem pode ser um potencial recurso no desenvolvimento de bioenergia e biocombustíveis [50,82]. Devido ao facto de serem capazes de tolerar condições extremas, as cianobactérias podem ainda ser usadas em processos de biorremediação, isto é, na remoção de poluentes presentes no meio ambiente, tais como metais pesados, herbicidas e pesticidas, e restaurar habitats degradados por fatores antropogénicos [26,50,91]. Todas estas potencialidades podem contribuir para o desenvolvimento sustentável e para a preservação do meio ambiente [26,50,82,86,91].



**Figura 1.5** - Aplicações das cianobactérias na biotecnologia.

A produção de metabolitos secundários por cianobactérias tem vindo a ser cada vez mais estudada pela comunidade científica [84,93,97,101]. Estes compostos bioativos que apresentam uma grande variedade de propriedades biológicas são produzidos intra e extracelularmente, na presença de diferentes condições ambientais [9,14,40,50,75,96]. Dos compostos até agora descritos, cerca de 58% são produzidos por espécies de cianobactérias pertencentes ao género *Oscillatoria*, ao passo que 35% deriva de estirpes do género *Lyngbya* [82]. Os compostos bioativos naturais produzidos pelas cianobactérias podem pertencer a diferentes classes químicas, nomeadamente alcalóides, depsipeptídeos, lipopéptidos, macrólidos, péptidos, terpenos, polissacáridos, lípidos e policetídeos [14,50,58,70,71,82,88,95,96]. Estes compostos possuem propriedades benéficas, tais como [26,50,71,82]:

- Fotoprotetoras - atuam contra a radiação solar;
- Antioxidantes - previnem os efeitos nocivos das espécies reativas de oxigénio;

- Nutricionais, probióticas, antimicrobianas (antibacterianas, antifúngicas e antivirais), anticancerígenas, imunossupressoras, anti inflamatórias, e inibidoras de proteases – melhoram a saúde do organismo.

Durante as últimas décadas, os compostos bioativos produzidos pelas cianobactérias têm sido essencialmente avaliados quanto às propriedades antimicrobianas contra bactérias e fungos [69,101,102]. No entanto, devido à emergência e disseminação de GRA, MRA e bactérias multirresistentes, tem sido atribuída particular relevância à avaliação de compostos bioativos com propriedades antibacterianas [69,76]. Tal como acontece para a maioria dos outros compostos bioativos sintetizados pelas cianobactérias, estes compostos antibacterianos parecem ser produzidos em resposta a fatores ambientais, bióticos e abióticos [10,74]. Porém, o facto de, em ecossistemas aquáticos, as cianobactérias encontrarem-se frequentemente expostas a bactérias multirresistentes e resíduos de antibióticos provenientes de alguns dos reatores genéticos mencionados no ponto 1.2, a produção de compostos naturais com atividade antibacteriana nas cianobactérias parece ser essencialmente um mecanismo de defesa [10,32,74,85,102].

A maior parte das cianobactérias que produzem compostos antibacterianos pertencem às ordens Nostocales e Oscillatoriales [9,14,72], e parecem habitar principalmente ambientes marinhos, de água doce e solos [17,44,103,104]. Ao longo das últimas décadas, as espécies de cianobactérias mais utilizadas para avaliar a produção de compostos antibacterianos foram a *Lyngbya majuscula*, a *Fischerella ambigua* e a *Nostoc* sp. [17,40,44,72,104]. Para além destas cianobactérias, a produção de compostos com atividade antibacteriana já foi verificada em várias espécies dos géneros *Dolichospermum*, *Scytonema* e *Leptolyngbya* [58,105]. A atividade antimicrobiana das cianobactérias tem-se revelado eficaz contra bactérias Gram positivas e Gram negativas [71,72]. Em particular, a atividade antibacteriana destes compostos foi principalmente verificada em estirpes de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Mycobacterium tuberculosis* [9,17,40,44,72,104]. Os compostos cianobacterianos com propriedades antibacterianas pertencem a diversas classes químicas, tais como depsipeptídeos, terpenos, macrólidos, alcalóides, derivadas de lactonas, policetídeos, péptidos, lípidos, compostos fenólicos (polifenóis e fenóis), compostos aromáticos e paraciclofanos [9,58,72,95]. Na Tabela 1.4 estão descritos compostos sintetizados por cianobactérias cuja atividade antibacteriana contra bactérias gram positivas e negativas já foi reportada.

**Tabela 1.4** - Atividade antibacteriana reportada em cianobactérias: compostos cianobacterianos com atividade antibacteriana, classe química a que pertencem, cianobactérias produtoras e estirpes de bactérias alvo. Gram positivo (G+); Gram negativo (G-).

Composto antibacteriano	Classe química	Cianobactéria	Bactéria alvo	Ref
<i>Malyngolide</i>	Lactonas	<i>Lyngbya majuscula</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i> (G+); <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (G-)	[17,72,106]
<i>Parsiguine</i>	-	<i>Fischerella</i> sp.	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (G+)	[44,107]
<i>Ambigol A</i>	Polifenóis	<i>Fischerella ambigua</i>	<i>Bacillus subtilis</i> (G+); <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (G-)	[17,72,108]
<i>Tjipanazole D</i>	Alcalóides	<i>Fischerella ambigua</i>	<i>Bacillus subtilis</i> (G+); <i>Micrococcus luteus</i> (G+)	[108]
<i>Kawaguchipectin A, B</i>	Péptidos	<i>Microcystis aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (G+)	[17,72,109]
<i>Noscomin</i>	Terpenos	<i>Nostoc commune</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (G+); <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (G-); <i>Staphylococcus epidermidis</i> (G+); <i>Escherichia coli</i> (G-)	[17,40,44,72]
<i>Comnostins A-E</i>	Terpenos	<i>Nostoc commune</i>	<i>Escherichia coli</i> (G-)	[17]
Ácido coriólico	-	<i>Limnothrix redekei</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (G+); <i>Micrococcus luteus</i> (G+)	[110]
<i>Nostocyclin A</i>	Acetilenos	<i>Nostoc</i> sp.	<i>Staphylococcus aureus</i> (G+)	[17,40,111]
<i>Pahayokolide A</i>	Péptidos	<i>Lyngbya</i> sp.	<i>Bacillus subtilis</i> (G+); <i>Bacillus megaterium</i> (G+)	[17,44,112]
Ácido gamalinolénico	Ácidos gordos	<i>Fischerella</i> sp.	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (G+); <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 (G-)	[17,44,113]
<i>Ambiguines H, I</i>	Alcalóides	<i>Fischerella ambigua</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (G+); <i>Bacillus subtilis</i> (G+)	[17,72,114]
<i>Hapalindoles G, H</i>	Isonitrilos	<i>Fischerella ambigua</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> ; <i>Mycobacterium smegmatis</i> (G+)	[17,72,115]
<i>Scytoscalarol</i>	Terpenos	<i>Scytonema</i> sp.	<i>Staphylococcus aureus</i> (G+); <i>Escherichia coli</i> (G-)	[17,72,116]
<i>Fischambiguine B</i>	Alcalóides	<i>Fischerella ambigua</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i> (G+)	[17,72,117]
Carbamida ciclofanos A-E	Policetídeos	<i>Nostoc</i> sp.	<i>Bacillus subtilis</i> (G+); <i>Staphylococcus aureus</i> (G+)	[40,72,104,118]
Carbamida ciclofanos H-L	Policetídeos	<i>Nostoc</i> sp.	MRSA (G+); <i>Streptococcus pneumoniae</i> (G+)	[72,104,119]
Carbamida ciclofanos F, G	Policetídeos	<i>Nostoc</i> sp.	<i>Staphylococcus aureus</i> (G+); <i>Enterococcus faecalis</i> (G+)	[72,103,104]
<i>Lagunamides A, B</i>	Depsipeptídeos	<i>Lyngbya majuscula</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (G-)	[104,120]

<i>Pitipeptolides</i> A, B	Depsipeptídeos	<i>Lyngbya majuscula</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	[9,72,104,121]
<i>Tenuocyclamides</i> A-D	Péptidos	<i>Nostoc spongiaeforme</i>	<i>Bacillus subtilis</i> (G+); <i>Staphylococcus aureus</i> (G+)	[40,122]
<i>Anaephenes</i> A-C	Policetídeos	Hormoscilla	MRSA (G+)	[72]
<i>Cybastacines</i> A, B	Terpenos	<i>Nostoc</i> sp.	<i>Enterococcus faecalis</i> (G+); <i>Staphylococcus aureus</i> (G+); <i>Staphylococcus epidermidis</i> (G+)	[123]
<i>Lyngbyazothrins</i> A-D	Péptidos	<i>Lyngbya</i> sp.	<i>Escherichia coli</i> (G-); <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (G-);	[9]
<i>Ficocianina</i> C	Pigmentos	<i>Arthrospira platensis</i>	<i>Escherichia coli</i> (G-); <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (G-); MRSA (G+)	[124]

A atividade antibacteriana de compostos produzidos pelas cianobactérias tem sido principalmente avaliada através da preparação de extratos de cianobactérias e posterior exposição das bactérias alvo aos mesmos [19,70,74]. A extração de compostos bioativos nas cianobactérias depende não só da espécie cianobacteriana em si, mas também é influenciada pelo método de extração e pela polaridade dos solventes utilizados durante a extração, uma vez que estes podem interferir nas propriedades químicas e físicas dos compostos extraídos [70,74]. Conforme a polaridade dos solventes, podem ser extraídos compostos polares ou apolares [70,74]. Os solventes que têm sido mais utilizados na preparação destes extratos são o metanol, o clorofórmio, o acetato de etilo e o hexano [9,17,19,40,44,50,100,104]. A extração de compostos bioativos pode ainda ser realizada de modo diferencial, isto é, aplicando cada um dos solventes separadamente, ou de forma sequencial, partindo sempre da mesma biomassa e aplicando sucessivamente cada um dos solventes [17,44,100]. A preparação de extratos cianobacterianos pode ainda incluir processos de liofilização, a utilização de enzimas e a realização de fermentação bacteriana [74]. Na literatura, os extratos cianobacterianos têm sido avaliados nas bactérias alvo maioritariamente através do método da Difusão em disco e da Microdiluição [17,44,100,104,125].

A produção de antibióticos a partir de culturas de cianobactérias é bastante promissora, principalmente em cianobactérias marinhas ou de água doce [17,40,58,84,92]. Isto deve-se ao facto de estes microrganismos autotróficos e fotossintéticos se encontrarem amplamente disponíveis na natureza e necessitarem apenas de luz e alguns nutrientes inorgânicos simples [17,40,76,84,92]. Adicionalmente, as cianobactérias são capazes de produzir diferentes compostos bioativos por alteração das condições de crescimento, o que possibilita a melhoria da bioatividade dos compostos e da produtividade do processo biotecnológico [40,84,102]. Porém, é necessário compreender melhor de que forma ocorre a produção destes compostos bioativos nas cianobactérias, e desenvolver métodos que permitam a obtenção de quantidades suficientes de biomassa, visto que as concentrações dos compostos extraídos das cianobactérias são reduzidas [17,71]. Apesar de o potencial antibacteriano das cianobactérias estar a ser cada vez mais estudado e de terem sido já descritos alguns compostos cianobacterianos com propriedades antibacterianas, no processo de desenvolvimento de fármacos apenas alguns destes compostos alcançaram a fase de ensaios clínicos, e nenhum deles foi ainda aprovado pelas autoridades competentes, nomeadamente a *Food and Drug Administration* [17,58,76,84].

## 2 Objetivos

Tendo em conta a problemática da disseminação e emergência de fenómenos de resistência a antibióticos e estirpes bacterianas multirresistentes, é essencial a pesquisa de novos antibióticos. Neste sentido, uma vez que já foi reportado o potencial antibacteriano de metabolitos secundários produzidos por algumas estirpes de cianobactérias, a produção de antibióticos naturais a partir de extratos cianobacterianos surge como uma alternativa bastante promissora. Contudo, apenas um número restrito de estirpes de cianobactérias e compostos com propriedades antibacterianas produzidos por estas foram avaliados e identificados.

A Coleção de Culturas de Algas Estela Sousa e Silva (ESSACC), património do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), aloja cerca de 140 estirpes de cianobactérias isoladas de recursos hídricos nacionais, pertencentes a diversos géneros como *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Leptolyngbya*, *Planktothrix*, *Dolichospermum* e *Aphanizomenon*. Algumas estirpes destes géneros foram descritas na literatura como produtoras de compostos com atividade antibacteriana.

Nesta perspetiva, este trabalho teve como principal objetivo a avaliação da capacidade antibacteriana de várias estirpes de cianobactérias da coleção de culturas ESSACC. Para tal, foram objetivos específicos deste trabalho:


- Produzir extratos de estirpes cianobacterianas isoladas de albufeiras e recursos hídricos de água doce, mantidas na coleção de culturas ESSACC;
- Avaliar o fenótipo de suscetibilidade de bactérias patogénicas em relação a esses extratos;
- Identificar as estirpes de cianobactérias que podem constituir potenciais fontes compostos antibacterianos, para a produção de antibióticos naturais.

### 3 Materiais e Métodos

#### 3.1 Reagentes e cuidados a ter na sua utilização

No decorrer deste trabalho foram utilizados diversos reagentes (Tabela 3.1), nomeadamente diclorometano, metanol e n-hexano, usados como solventes nos procedimentos de extração dos compostos bioativos a partir da biomassa, e dimetilsulfóxido (DMSO), para a dissolução dos extratos das cianobactérias.

Tabela 3.1 - Reagentes usados no estudo.

Reagentes	Pictogramas de perigo	Informação adicional
Diclorometano (D-8418)		Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha
Metanol		Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha
n-Hexano		Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha
Dimetilsulfóxido	Substância ou mistura não perigosa*	Sigma-Aldrich, França

(\*) Classificado de acordo com o Regulamento (CE) No. 1272/2008

A utilização destas substâncias químicas pode ter efeitos nocivos e, como tal, requer alguns cuidados [126–130]. O diclorometano e o n-hexano são aqueles cuja manipulação pode apresentar maior perigo, na medida em que, na sequência de um acidente, a gravidade dos sintomas e efeitos provocados é mais elevada, uma vez que o diclorometano pode provocar irritação ocular grave ou ter efeitos carcinogénicos, e o n-hexano pode afetar a fertilidade ou causar morte por exposição das vias respiratórias [126,128,129]. A exposição por inalação a DMSO pode provocar efeitos irritantes e sintomas como cansaço e náuseas, apesar deste não estar classificado como uma substância perigosa e ser normalmente usado como solvente em estudos das propriedades farmacológicas de compostos, designadamente de extratos naturais [130].

Tendo isto presente, os solventes foram manuseados numa *Hotte*, de maneira a assegurar ventilação adequada e evitar a exposição do operador. Adicionalmente, recorreu-se à utilização de equipamento de proteção individual recomendado, nomeadamente ao uso de luvas de nitrilo. Relativamente a condições de armazenamento, estas substâncias devem encontrar-se hermeticamente fechadas e ser guardadas num local arejado e fechado, ao abrigo da luz.

#### 3.2 Estirpes de bactérias patogénicas

O efeito antibacteriano das cianobactérias em estudo foi testado em nove estirpes de bactérias patogénicas, seis gram-positivas e três gram-negativas, descritas na Tabela 3.2.

**Tabela 3.2** - Estirpes de bactérias patogênicas avaliadas. (+) Gram positiva. (-) Gram negativa.

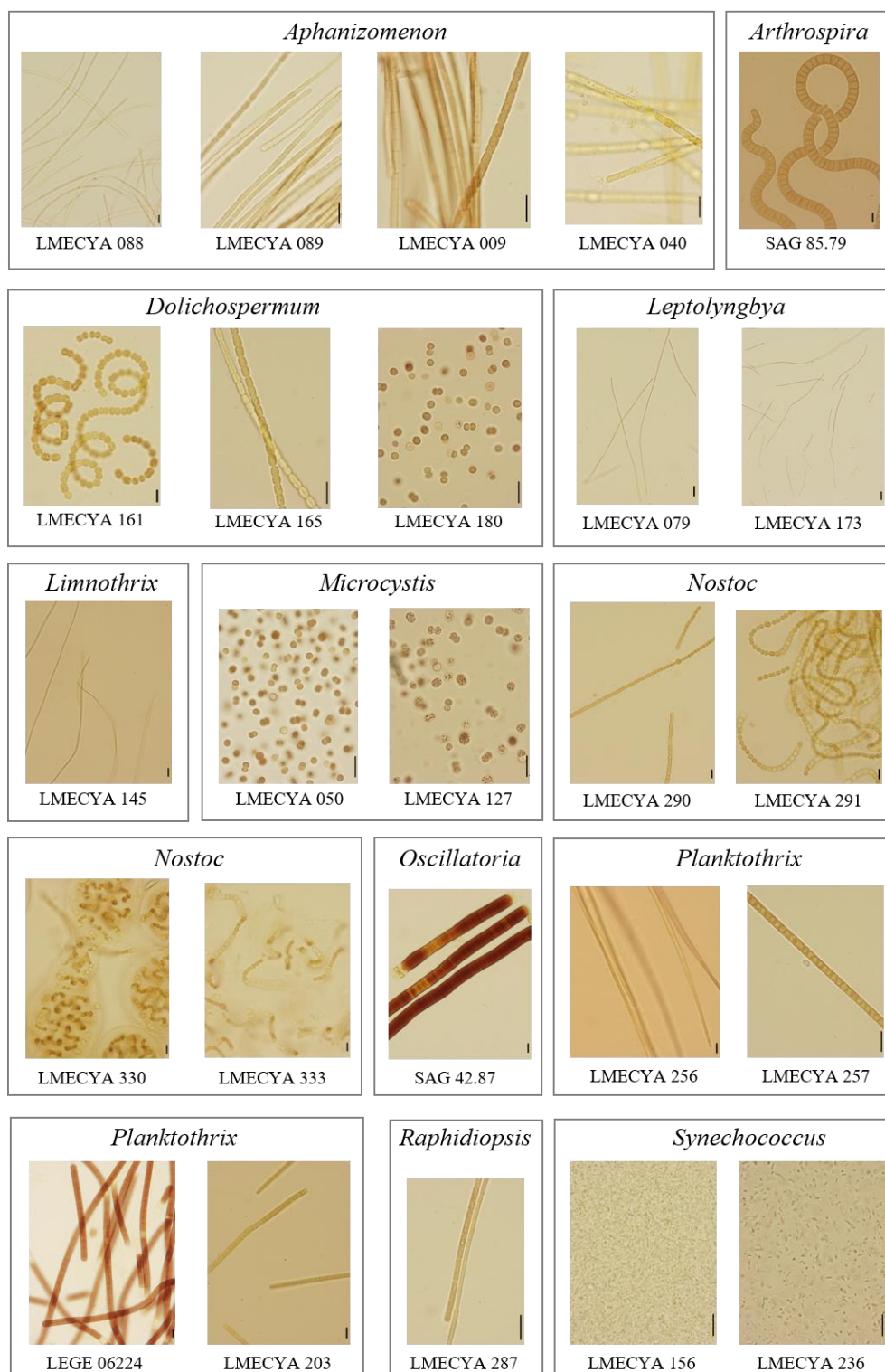
Estirpe de bactéria	Código da estirpe	Classificação Gram
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	+
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	-
<i>Escherichia coli</i>	NCTC 13846	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	URRA 872	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	URRA 958	+
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	URRA 840	+
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	URRA 867	+

Estas estirpes bacterianas foram cedidas pelo Laboratório Nacional de Referência da Resistência aos Antibióticos e Infecções Associadas aos Cuidados de Saúde (LNR-RA/IACS), do Departamento de Doenças Infecciosas (DDI) do INSA, local onde foi avaliado o seu fenótipo de suscetibilidade aos extratos cianobacterianos [131,132].

As estirpes URRA são estirpes isoladas de amostras clínicas, no âmbito do sistema de Vigilância Epidemiológica das Resistência aos Antimicrobianos do LNR-RA/IACS [131,132]. Por outro lado, as estirpes ATCC e NCTC são microrganismos usados para efeitos de controlo de qualidade deste programa. As estirpes ATCC são estirpes de referência adquiridas na coleção de culturas de bactérias da “*American Type Culture Collection*” (ATCC), e as NCTC, por sua vez, são estirpes de bactérias de relevância clínica obtidas na coleção de culturas da “*National Collection of Type Cultures*” (NCTC) [133,134].

### 3.3 Estirpes de cianobactérias: origem e condições de cultura

Neste trabalho, foram avaliadas vinte e cinco estirpes de cianobactérias pertencentes aos géneros *Aphanizomenon*, *Arthrospira*, *Dolichospermum*, *Leptolyngbya*, *Limnothrix*, *Microcystis*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Planktothrix*, *Raphidiopsis* e *Synechococcus*. Estas estirpes apresentam características morfológicas bastante distintas, tal como se exemplifica na Figura 3.1.



**Figura 3.1** - Estirpes de cianobactérias estudadas, pertencentes à coleção ESSACC. As cianobactérias analisadas foram: *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088), *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 089), *Aphanizomenon gracile* (LMECYA 009), *Aphanizomenon gracile* (LMECYA 040), *Arthrospira platensis* (SAG 85.79), *Dolichospermum flos-aquae* (LMECYA 165), *Dolichospermum flos-aquae* (LMECYA 180), *Dolichospermum spiroides* (LMECYA 161), *Leptolyngbya* sp. (LMECYA 079), *Leptolyngbya* sp. (LMECYA 173), *Limnothrix redekei* (LMECYA 145), *Microcystis aeruginosa* (LMECYA 050), *Microcystis aeruginosa* (LMECYA 127), *Nostoc* sp. (LMECYA 330), *Nostoc* sp. (LMECYA 290), *Nostoc commune* (LMECYA 291), *Nostoc* sp. (LMECYA 333), *Oscillatoria limosa* (SAG 42.87), *Planktothrix agardhii* (LMECYA 256), *Planktothrix agardhii* (LMECYA 257), *Planktothrix mougeotii* (LEGE 06224), *Planktothrix rubescens* (LMECYA 203), *Raphidiopsis mediterranea* (LMECYA 287), *Synechococcus nidulans* (LMECYA 156) e *Synechococcus nidulans* (LMECYA 236). Estes registos fotográficos foram realizados através de um microscópio ótico Olympus PM-PB20, Tóquio, Japão, a 400x e 1000x. Barra de escala = 10µm (Fotografias de Iara Dias, 2021).

A maior parte destas estirpes foi isolada de albufeiras portuguesas, e integra a coleção de culturas de algas ESSACC do Laboratório de Biologia e Ecotoxicologia (ASBE) do INSA [135]. Todavia, foram ainda analisadas duas estirpes provenientes da coleção de culturas “*Sammlung von Algenkulturen*” (SAG), alojada na universidade alemã de Göttingen, e uma estirpe provinda da coleção de culturas “*Blue Biotechnology and Ecotoxicology*” (LEGE-CC), alojada no Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR) [136,137]. A descrição de todas as estirpes estudadas encontra-se na Tabela 3.3.

**Tabela 3.3** - Estirpes de cianobactérias analisadas e respetiva origem.

Estirpe de cianobactéria	Código da estirpe	Local de Isolamento	Ano de Isolamento
Coleção de culturas ESSACC			
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	LMECYA 088	Albufeira de Montargil	1999
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	LMECYA 089	Albufeira de Montargil	1999
<i>Aphanizomenon gracile</i>	LMECYA 009	Albufeira do Peneireiro	1996
<i>Aphanizomenon gracile</i>	LMECYA 040	Albufeira do Crato	1996
<i>Dolichospermum flos-aquae</i>	LMECYA 165	Albufeira de Magos	2003
<i>Dolichospermum flos-aquae</i>	LMECYA 180	Rio Guadiana, Vitonogales/Espanha	1999
<i>Dolichospermum spiroides</i>	LMECYA 161	Açude da Agolada de Baixo	2003
<i>Leptolyngbya</i> sp.	LMECYA 079	Albufeira de Magos	1998
<i>Leptolyngbya</i> sp.	LMECYA 173	Fonte hidrotermal	2003
<i>Limnothrix redekei</i>	LMECYA 145	Albufeira de Magos	2001
<i>Microcystis aeruginosa</i>	LMECYA 050	Albufeira do Roxo	1997
<i>Microcystis aeruginosa</i>	LMECYA 127	Albufeira de Montargil	2000
<i>Nostoc</i> sp.	LMECYA 290	Calçada, Campo Grande	2012
<i>Nostoc commune</i>	LMECYA 291	Canteiro, Lisboa	2013
<i>Nostoc</i> sp.	LMECYA 330	Canteiro, Lisboa	-
<i>Nostoc</i> sp.	LMECYA 333	Calçada, Pinhal Novo	2014
<i>Planktothrix agardhii</i>	LMECYA 256	Albufeira de São Domingos	2009
<i>Planktothrix agardhii</i>	LMECYA 257	Albufeira de São Domingos	2009
<i>Planktothrix rubescens</i>	LMECYA 203	Albufeira do Beliche	2005
<i>Raphidiopsis mediterranea</i>	LMECYA 287	Albufeira de Patudos	2012
<i>Synechococcus nidulans</i>	LMECYA 236	Lagoa da Vela	2005
<i>Synechococcus nidulans</i>	LMECYA 156	Lago, Porto	2001
Coleção de culturas SAG			
<i>Arthrospira platensis</i>	SAG 85.79	Lago Natron, Tanzânia	-
<i>Oscillatoria limosa</i>	SAG 42.87	Lago River, Suíça	-
Coleção de culturas LEGE			
<i>Planktothrix mougeotii</i>	LEGE 06224	Etar de Febros	-

As estirpes estudadas são mantidas na câmara de culturas da ESSACC (Figura 3.2), em frascos de cultura com meio Z8 [138], em condições controladas de intensidade luminosa ( $20 \pm 4 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , num ciclo de luz/escuridão de 14/10 horas), e de temperatura ( $20 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Estas culturas não axénicas<sup>3</sup> são repicadas frequentemente, de modo a manter a sua viabilidade.



**Figura 3.2** - Exemplo de culturas de cianobactérias nas instalações da ESSACC.

### 3.4 Preparação dos extratos cianobacterianos

#### 3.4.1 Produção de biomassa

O passo inicial deste estudo foi a obtenção da biomassa das estirpes cianobacterianas mencionadas em 3.3. Para tal, as estirpes foram individualmente inoculadas em balões de 6 L com 5 L de meio Z8 [138], nas condições de luz e temperatura referidas no ponto anterior. Cada balão foi colocado sob arejamento Figura 3.3, de modo a permitir as trocas gasosas e evitar a sedimentação das células, ao mantê-las em movimento. A fase exponencial de crescimento das estirpes foi atingida em cerca de 30 dias.



**Figura 3.3** - Acomodação dos balões de cultura de cianobactérias nas instalações da coleção ESSACC.

No fim daquele período, procedeu-se à recolha da biomassa, procedimento que se dividiu em duas fases. A primeira corresponde à transferência do conteúdo do balão onde cada estirpe foi inoculada para ampolas de decantação, de modo a promover a separação entre o meio e a biomassa, processo que decorre de um dia para o outro. Seria esperado observar-se uma separação clara entre os dois componentes, meio e biomassa (devido à presença de vesículas gasosas nas células cianobacterianas), o que permitiria descartar grande parte do meio.

Contudo, para a maior parte das estirpes isso não foi possível, o que acabou por dificultar a segunda fase da recolha da biomassa por centrifugação sucessiva das culturas (centrífuga *Beckman J2-*

<sup>3</sup> Culturas axénicas são culturas não contaminadas por qualquer outro microrganismo.

14 M/E, *Newton*, CT, EUA), a 8000xg, durante 15 minutos, a 4 °C. No entanto, estas condições variaram consoante a eficácia da separação entre o meio e a biomassa, requerendo nalguns casos maior velocidade e/ou tempo de centrifugação.

A biomassa concentrada obtida para cada estirpe foi armazenada a -20 °C. Depois de congelada, a biomassa foi colocada num liofilizador (*Thermo Scientific Savant Speedvac AES 1000, Waltham, MA, EUA*), cerca de uma semana, até eliminar todo o seu conteúdo aquoso. A liofilização é um procedimento que, através de um processo de sublimação do gelo a vácuo, conduz à diminuição da quantidade de água presente numa amostra congelada até esta ficar completamente desidratada [139–141]. A biomassa liofilizada foi reduzida a pó, e colocada em frascos de vidro, que foram previa e posteriormente pesados numa balança analítica (*Mettler, H10w, Columbus, EUA*) e armazenados a -20 °C até posterior utilização.

### 3.4.2 Extração dos compostos da biomassa com solventes

Após a liofilização do material biológico, seguiu-se a etapa final necessária à obtenção dos extratos cianobacterianos, a extração dos compostos da biomassa com solventes. Após consulta de bibliografia relativa a este procedimento, constatou-se que a extração poderia ser realizada de duas formas distintas: sequencialmente ou diferencialmente [139–141]. Porém, verificou-se que a maior parte dos autores realizava este processo de forma sequencial, isto é, aplicando sucessivamente cada um dos solventes de extração na mesma biomassa. De igual maneira, constatou-se que o processo de extração pode ocorrer de forma a serem extraídos compostos com polaridade crescente, ou seja, partindo dos solventes menos polares para os mais polares, ou de forma contrária, isto é, partido dos solventes mais polares para os menos polares [139–141].

Deste modo, optou-se por efetuar o processo de extração sequencial, com hexano, com a mistura diclorometano:metanol (2:1), metanol 70% e água. No entanto, no que diz respeito à ordem de aplicação dos solventes, estipulou-se que seriam realizadas para cada estirpe duas extrações, com duas ordens de aplicação dos solventes, de acordo com a sua polaridade, (I) e (II), representadas no esquema seguinte:

(I) n-Hexano → Diclorometano:Metanol (2:1) → Metanol 70% → Água  
(II) Metanol 70% → Diclorometano:Metanol (2:1) → n-Hexano

Na ordem de extração descrita em (I) partiu-se do solvente menos polar para o mais polar, ao passo que na ordem descrita em (II) a aplicação dos solventes ocorreu de forma contrária, isto é, do solvente mais polar para o menos polar. Apenas na primeira sequência se incluiu a água como solvente.

Inicialmente, pretendia realizar-se as duas extrações para cada estirpe, cada uma partindo de 500 mg de biomassa liofilizada. Para tal, teria de se obter, pelo menos, 1 g de material liofilizado de cada estirpe de cianobactéria. Todavia, só foi possível realizar ambas as extrações, (I) e (II), em 15 das 25 estirpes de cianobactérias, por indisponibilidade de biomassa liofilizada para as restantes 10 estirpes, assinaladas com (\*) na tabela do rendimento de cada estirpe (Tabela II.1, anexo II). Estas 10 estirpes foram extraídas apenas de acordo com a ordem de extração (I), após análise dos primeiros resultados de avaliação dos extratos em bactérias e constatação de que a maior parte dos extratos onde se verificou eventual atividade antibacteriana tinha sido obtida através dessa ordem de extração.

O protocolo de extração da biomassa com solventes foi adaptado da bibliografia consultada [139–141], e encontra-se pormenorizadamente descrito no anexo III. As 25 estirpes foram extraídas em grupos de 5 estirpes, de cada vez. De um modo sucinto, cerca de 500 mg de material liofilizado de cada estirpe foi sujeito à aplicação sucessiva dos solventes hexano, diclorometano:metanol (2:1), metanol 70% e água, de forma a extrair compostos com polaridade crescente ou decrescente, dependendo da ordem de extração. Assim, o procedimento iniciou-se com a aplicação, à temperatura ambiente, do primeiro solvente no frasco com a biomassa liofilizada, seguindo-se um ciclo de agitação (30 min), sonicação em gelo (1 min) e nova agitação (30 min) do conteúdo do frasco, de forma a ocorrer a extração dos compostos. Findo o ciclo de agitação e sonicação, a solução obtida foi transferida para um tubo de polipropileno (PP) e sujeita a duas centrifugações, em condições que variaram de acordo com o solvente. Após a segunda centrifugação, o sobrenadante obtido, correspondente ao extrato, foi transferido para um novo tubo PP, que foi previamente pesado. A biomassa residual resultante das centrifugações foi recolhida, e repetiu-se o procedimento de extração anterior para os outros solventes, de acordo com a ordem de extração.

Depois de terminado o processo de extração, os extratos obtidos com os solventes hexano, diclorometano e metanol foram colocados num evaporador com jato de azoto (*TurboVap®LV*), de modo a promover a secagem destes solventes, em condições que variaram de acordo com o tipo de solvente (ver anexo III). Os extratos que continham a água como solvente foram, por sua vez, colocados no liofilizador, onde permaneceram por cerca de 3 dias. Após a evaporação completa dos solventes, os tubos PP com cada extrato foram pesados e a quantidade de extrato bruto foi calculada, de acordo com a seguinte fórmula:

$$Peso_{Extrato\ bruto} = Peso_{Tubo\ PP+Extrato} - Peso_{Tubo\ PP}$$

Posteriormente, cada extrato foi dissolvido com DMSO a 25%, centrifugado (a 8000 rpm, 5 min, 4 °C) e a solução obtida foi transferida para tubos eppendorf de 2 mL. O protocolo do procedimento de dissolução dos extratos com DMSO a 25% encontra-se descrito detalhadamente no anexo IV. Os extratos finais foram conservados a -20 °C, para futura utilização.

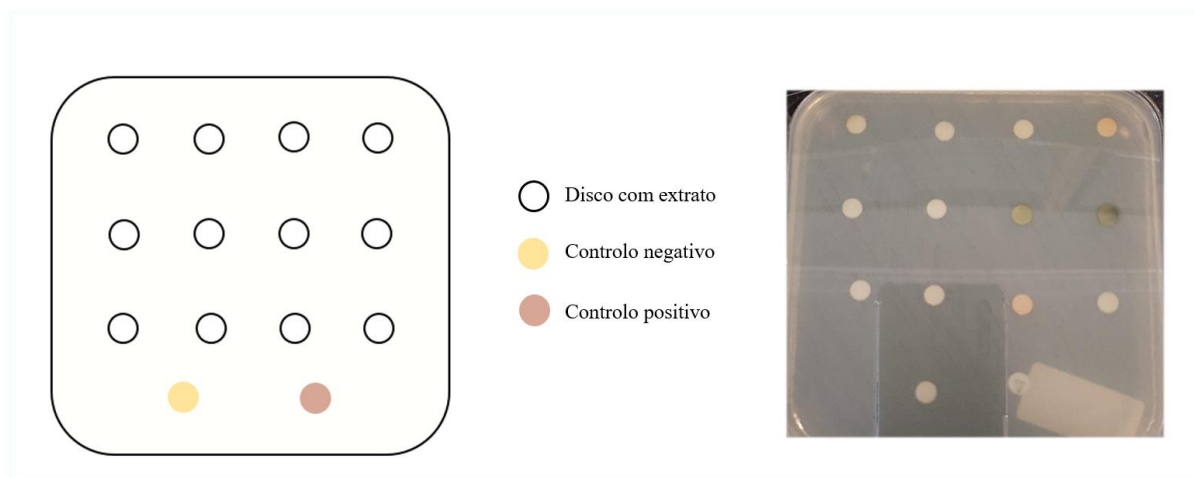
### 3.5 Avaliação da toxicidade do DMSO usado na dissolução dos extratos cianobacterianos

Previamente à dissolução dos extratos cianobacterianos obtidos, o efeito do solvente DMSO foi testado em algumas das bactérias em análise, nomeadamente *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* NCTC 13846, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, de modo a evitar interferências deste nos resultados relativos ao efeito dos extratos no crescimento das bactérias. Assim, foram testadas diferentes concentrações de DMSO, nomeadamente 100%, 60%, 30%, 15%, 7,5% e 3,75%, nas bactérias mencionadas, com o objetivo de determinar a concentração mínima deste solvente a que não ocorre inibição do crescimento das células bacterianas, e que, portanto, pode ser usada para dissolver os extratos.

Para tal, foram dispostos discos em branco em placas de meio *Mueller-Hinton* sólido (MHA), num número equivalente ao número de diferentes concentrações de DMSO a testar. Em cada disco foram aplicados 10 µL de uma concentração de DMSO em discos previamente colocados em cada placa inoculada com uma das bactérias. As placas com as bactérias expostas ao DMSO foram colocadas numa estufa a 37 °C, onde permaneceram 18 h ± 2 h. Após este período, observou-se se o DMSO induziu halo de inibição do crescimento das bactérias.

### 3.6 Avaliação do efeito dos extratos cianobacterianos no crescimento de bactérias patogênicas

As propriedades antibacterianas dos extratos das cianobactérias foram avaliadas nas bactérias patogênicas mencionadas em 3.2. através do método da Difusão em Disco, metodologia *standard* de microbiologia que obedece a *guidelines* internacionais, de acordo com as normas do Comité Europeu de Avaliação de Suscetibilidade Antimicrobiana (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Test*, EUCAST) [142,143]. Os extratos obtidos para cada cianobactéria foram avaliados em simultâneo, de acordo com o esquema da Figura 3.4.



**Figura 3.4** - Esquema da placa para avaliação do efeito dos extratos das cianobactérias no crescimento das bactérias (esq.) e placa exemplificativa do teste em *Escherichia coli* NCTC 13846 (dta.). Controlo negativo, disco com DMSO a 25%. Controlo positivo, disco com o antibiótico de referência para a estirpe bacteriana em estudo.

Deste modo, cada bactéria foi inoculada numa placa contendo meio MHA, numa densidade correspondente a 0,5 *McFarland*, de acordo com os procedimentos EUCAST [142]. Em seguida, foram colocados discos estéreis, para aplicação dos extratos e do controlo negativo (DMSO a 25%, solvente usado para dissolver os extratos), como foi exemplificado na Figura 3.4. Usou-se também um controlo positivo, um antibiótico de referência para cada bactéria. Os discos correspondentes aos extratos cianobacterianos e ao DMSO a 25% foram impregnados com 10  $\mu$ L de cada solução. As placas com as bactérias inoculadas e expostas aos extratos foram mantidas durante 18 h  $\pm$  2 h numa estufa, a 37 °C. Após o período de incubação, procedeu-se à observação das placas e subsequente medição dos halos de inibição em torno dos discos, o que permitiu avaliar a sensibilidade das bactérias aos extratos cianobacterianos.

A análise dos controlos positivos foi feita com base na gama de valores de referência para cada antibiótico, estabelecida pelo EUCAST [142]. Quanto ao controlo negativo, verificou-se a sua validade pela ausência de halos de inibição e ocorrência de crescimento bacteriano até ao limite do disco (*contact disk*). Para os extratos que evidenciaram ter efeito nas bactérias alvo o teste da difusão em disco foi realizado em triplicados, em duas experiências independentes.

### 3.7 Determinação da Concentração Inibitória Mínima dos extratos de cianobactérias

A suscetibilidade das bactérias aos extratos cianobacterianos observada pelo método da difusão em disco foi confirmada através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de cada extrato para a bactéria-alvo, isto é, a mais baixa concentração de extrato que inibe totalmente o

crescimento bacteriano visível a olho nu. O valor da CIM de cada extrato foi determinado pelo método da Microdiluição, metodologia baseada nos procedimentos EUCAST que avalia, em meio de cultura líquido, o crescimento celular de um microrganismo na presença de diferentes diluições de um antibiótico de referência [142]. Na microplaca, foram avaliadas três concentrações de cada extrato.

Assim, procedeu-se à inoculação da suspensão bacteriana a avaliar numa microplaca de 96 poços de fundo cônico, à qual tinham sido previamente adicionados meio *Mueller-Hinton* líquido (MHB) [143], os extratos a avaliar e os controlos positivos, negativos e de crescimento da bactéria em análise (Figura 3.5), de acordo com o procedimento especificado no anexo VI.

	Extratos 25%			Extratos 12,5%			Extratos 6,3%					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	E1	E1	E1	E1	E1	E1	E1	E1	E1	CS1	CS1	CS1
B	E2	E2	E2	E2	E2	E2	E2	E2	E2	CS2	CS2	CS2
C	E3	E3	E3	E3	E3	E3	E3	E3	E3	CS3	CS3	CS3
D	E4	E4	E4	E4	E4	E4	E4	E4	E4	CC	CC	CC
E	E5	E5	E5	E5	E5	E5	E5	E5	E5	CN	CN	CN
F	E6	E6	E6	E6	E6	E6	E6	E6	E6	16	8	4
G	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	2	1	0,5
H	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,25	0,125	0,06

**Figura 3.5** - Esquema da microplaca usada para determinação do valor da CIM dos extratos. Os poços E1, E2, E3, E4, E5 e E6 contêm os extratos cianobacterianos, em três concentrações diferentes: 25  $\mu\text{L}_{\text{Extrato}}/100\mu\text{L}_{\text{Volume final}}$  (25% v/v, colunas 1-3), 12,5  $\mu\text{L}_{\text{Extrato}}/100\mu\text{L}_{\text{Volume final}}$  (12,5% v/v, colunas 4-6) e 6,25  $\mu\text{L}_{\text{Extrato}}/100\mu\text{L}_{\text{Volume final}}$  (6,3% v/v, colunas 7-9). Os poços CS representam o controlo do solvente (DMSO CS1-25%, CS2-12,5% e CS3-6,25%). Os poços CC são o controlo do crescimento da estirpe bacteriana em estudo. Os poços CN referem-se ao controlo negativo (meio MHB). As soluções diluídas de Imipenem foram adicionadas aos poços representados por números na fração azul da microplaca e que correspondem ao valor da concentração de antibiótico em mg/L.

Os controlos positivos do teste foram soluções diluídas do antibiótico de referência para as bactérias-alvo, conforme as gamas de valores dos antibióticos de referência para o crescimento das bactérias patogénicas alvo, estabelecidas pelo EUCAST [142]. Por sua vez, usaram-se como controlos negativos soluções do solvente usado na dissolução dos extratos, o DMSO a 25%, na mesma diluição dos extratos.

Foram também analisados o crescimento do inóculo bacteriano e a esterilidade do meio MHB, em placas com meio MHA [143]. A realização do controlo do inóculo bacteriano permitiu avaliar a pureza e o número de colónias da estirpe bacteriana. Para este controlo, o expectável seria obter entre 20 a 80 colónias na placa, dado que isto seria indicativo de viabilidade da bactéria. Quanto ao controlo da esterilidade do meio, este teve como objetivo verificar a qualidade do mesmo e a ausência de contaminação por algum microrganismo. Neste caso, o esperado seria não obter nenhuma colónia.

No que concerne à análise dos resultados deste método, o crescimento da bactéria patogénica foi verificado por observação de turvação do meio e presença de depósito bacteriano no fundo do poço da microplaca, após  $18 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$  de incubação com os extratos e controlos a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Complementarmente, para confirmar os resultados obtidos no teste da microdiluição, foram efetuados os procedimentos indicados em 3.7.1 e 3.7.2.

### 3.7.1 Inoculação em placas de gelose simples

Logo após a visualização dos resultados do teste da microdiluição, realizou-se a inoculação de alíquotas ( $33\mu\text{L}$ ) dos poços da microplaca onde se observava ausência de crescimento da bactéria patogénica exposta aos extratos cianobacterianos, em placas com meio gelose simples. As placas foram analisadas  $18 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ , depois de incubadas a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  quanto à ausência ou presença de crescimento da bactéria alvo.

### 3.7.2 Observação ao microscópio ótico a 400x e a 1000x

Para confirmar os resultados obtidos no teste da microdiluição efetuou-se a observação de preparações com alíquotas dos poços ao microscópio ótico a 400x e a 1000x (*Olympus BX60*, com câmara *Olympus PM-PB20*, Tóquio, Japão). Este procedimento permitiu não só verificar a ausência ou presença de crescimento bacteriano, como também possibilitou observar a morfologia das células bacterianas.

## 3.8 Avaliação da atividade adjuvante de extratos cianobacterianos

Para além da avaliação do efeito antibacteriano dos extratos das cianobactérias, procedeu-se à análise de um potencial efeito coadjuvante dos extratos nos antibióticos para os quais a suscetibilidade das bactérias patogénicas em estudo é conhecida.

Fundamentalmente, o princípio desta avaliação consistiu em verificar se a adição dos extratos cianobacterianos aos discos impregnados de antibióticos de referência se traduzia num aumento da eficácia desses antibióticos. A existência de atividade adjuvante foi apenas analisada nos extratos que produziram um halo de inibição de crescimento das bactérias patogénicas considerado significativo, isto é, maior que 10 mm, pelo teste da difusão em disco.

Posto isto, esta avaliação baseou-se na realização de Testes de Suscetibilidade aos Antibióticos (TSA), pela inoculação das seguintes placas em meio MHA com a bactéria onde se verificou efeito do extrato:

- Placa com os discos dos antibióticos de referência (controlo positivo);
- Placa com os discos dos antibióticos de referência +  $10 \mu\text{L}$  de DMSO a 25% (controlo negativo);
- Placa com os discos dos antibióticos de referência +  $10 \mu\text{L}$  de extrato cianobacteriano.

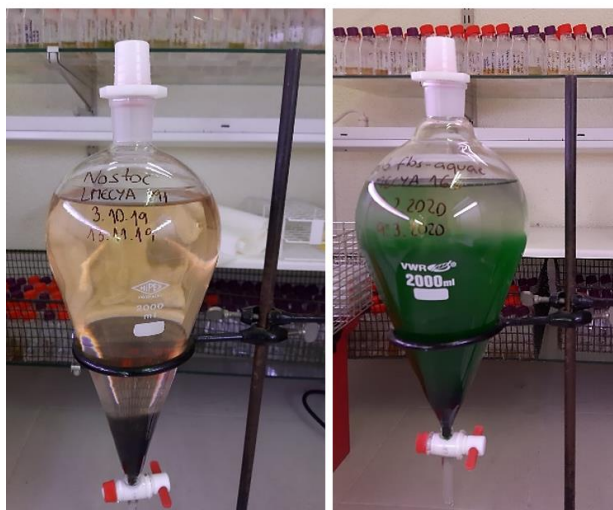
As placas inoculadas foram mantidas numa estufa durante  $18 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ , a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . No fim do período de incubação, realizou-se a observação das placas, o registo dos diâmetros dos halos formados e a comparação com os controlos. De acordo com as normas EUCAST, existe um efeito sinérgico do extrato no antibiótico se o diâmetro do respetivo halo formado na presença do antibiótico exceder em mais de 3 mm ( $> 3 \text{ mm}$ ) o halo de inibição formado pelo controlo negativo [142], de acordo com a seguinte equação:

$$\emptyset \text{ halo de inibição}_{\text{AB+extrato}} > \emptyset \text{ halo de inibição}_{\text{AB+DMSO 25\%}} + 3 \text{ mm}$$

## 4 Resultados

### 4.1 Produção e extração da biomassa das estirpes cianobacterianas

Para a maioria das vinte e cinco estirpes de cianobactérias analisadas, a fase exponencial do crescimento foi alcançada após cerca de 30 dias. Relativamente ao processo de decantação, registaram-se diferenças entre as estirpes (Figura 4.1). Por exemplo, estirpes como a *Nostoc* sp. (LMECYA 290), a *Oscillatoria limosa* (SAG 42.87) e a *Planktothrix agardhii* (LMECYA 257) decantaram corretamente, isto é, ocorreu uma separação clara entre o meio e biomassa, ao passo que para outras estirpes não se registou uma separação evidente entre o meio e a biomassa. As estirpes *Microcystis aeruginosa* (LMECYA 050) e *Leptolyngbya* sp. (LMECYA 079) não decantaram. Por sua vez, as estirpes *Dolichospermum spiroides* (LMECYA 161) e *Raphidiopsis mediterranea* (LMECYA 287) formaram aglomerados na parte superior da ampola de decantação. Assim, para muitas das estirpes, não foi possível descartar o meio de cultura, o que implicou centrifugar a totalidade da cultura. Esta dificuldade no processo de decantação pode ter ocorrido devido à presença de vesículas gasosas no meio de cultura. As cianobactérias produzem vesículas gasosas que lhes conferem a capacidade de controlar a sua flutuabilidade, característica associada à sua migração ao longo da coluna de água, em ambientes aquáticos [26]. Por outro lado, as condições de centrifugação variaram entre as estirpes, umas requerendo mais tempo e velocidade de centrifugação do que outras, o que também dificultou o processo de obtenção de biomassa.



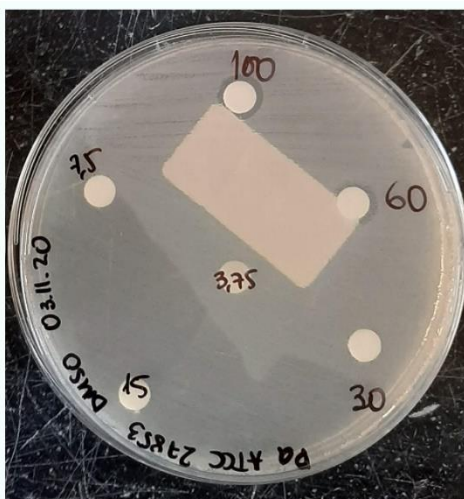
**Figura 4.1** - Decantação da biomassa das estirpes cianobacterianas *Nostoc commune* (LMECYA 291) e *Dolichospermum flos-aquae* (LMECYA 165).

O rendimento de biomassa liofilizada obtido para cada uma das estirpes de cianobactérias está descrito na tabela II.1 do anexo II. Obteve-se cerca de 1 g de biomassa liofilizada para a maior parte das estirpes. Nas estirpes *Arthrospira platensis* (SAG 85.79), *Leptolyngbya* sp. (LMECYA 079) e *Oscillatoria limosa* (SAG 42.87) obtiveram-se quantidades de biomassa liofilizada de cerca de 3 g. Contrariamente, para as estirpes *Dolichospermum flos-aquae* (LMECYA 165), *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 089), *Aphanizomenon gracile* (LMECYA 040), *Leptolyngbya* sp. (LMECYA 173), *Nostoc* sp. (LMECYA 291), *Nostoc* sp. (LMECYA 333), *Planktothrix mougeotii* (LEGE 06224), *Planktothrix rubescens* (LMECYA 203), *Raphidiopsis mediterranea* (LMECYA 287), e *Synechococcus nidulans* (LMECYA 156), obtiveram-se quantidades reduzidas de biomassa (entre 0,3 e 0,7 g).

Para as 15 estirpes cujo rendimento de biomassa foi  $\geq 1$  g, realizaram-se as duas sequências de extração (I e II), usando 500 mg de biomassa para cada uma. No entanto, pelos motivos acima referidos, não se obteve biomassa suficiente para 10 estirpes, pelo que apenas foi possível realizar uma sequência de extração, tendo-se optado pela sequência I. De referir, ainda, que devido a um incidente laboratorial, o extrato metanólico (I) de *Planktothrix agardhii* (LMECYA 256) ficou inviabilizado para avaliação do efeito antibacteriano.

#### 4.2 Avaliação da toxicidade do DMSO

O DMSO foi o solvente selecionado para dissolver os extratos cianobacterianos. Contudo, uma vez que este reagente pode interferir com o crescimento bacteriano, foi realizada uma avaliação prévia da toxicidade de uma série de concentrações deste solvente (100%; 60%; 30%; 15%; 7,5%; 3,75%) nalgumas das bactérias alvo. Constatou-se que ocorria inibição do crescimento das bactérias na presença das concentrações 100 e 60% do solvente, pelo que se optou por usar DMSO a 25% na dissolução dos extratos das cianobactérias (Figura 4.2).



**Figura 4.2-** Avaliação do efeito de diferentes concentrações do DMSO (100, 60, 30, 15, 7,5 e 3,75%) no crescimento de *P. aeruginosa* ATCC 27853.

#### 4.3 Efeito antibacteriano dos extratos de cianobactérias

A potencial atividade antibacteriana dos extratos nas bactérias-alvo foi analisada através do método da difusão em disco, mediante a avaliação do diâmetro do halo de inibição do crescimento bacteriano em torno do disco impregnado com 10 $\mu$ L de extrato cianobacteriano.

Procedeu-se ainda à análise do controlo negativo, o DMSO a 25%, e do controlo positivo, o antibiótico de referência para cada bactéria. O DMSO a 25% não apresentou atividade inibitória no crescimento das bactérias testadas, uma vez que, para todas, se observou crescimento bacteriano até ao limite do disco. Relativamente aos controlos positivos, cada um foi analisado por comparação dos valores dos halos de inibição obtidos com a gama de valores de referência do EUCAST.

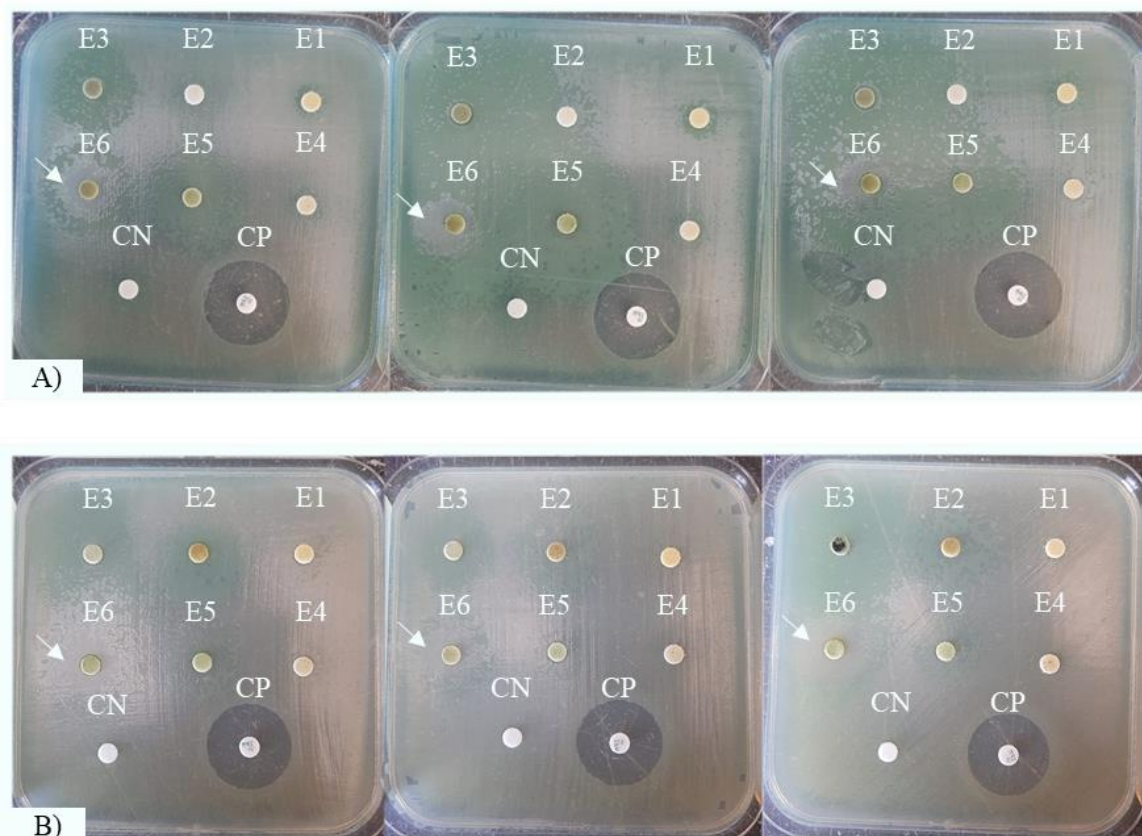
Analisando os resultados, verificou-se que grande parte dos extratos das cianobactérias não teve qualquer efeito antibacteriano. Na Tabela 4.1 estão representados os extratos para os quais se registou alguma interferência no crescimento das bactérias alvo.

**Tabela 4.1** – Extratos cianobacterianos que induziram inibição do crescimento de bactérias patogênicas e respectivos halos de inibição. Os números (I) e (II) indicados nos solventes correspondem à sequência de extração da biomassa pela qual os extratos foram obtidos. O sinal (\*) é indicativo de formação de halo ligeiro não significativo ( $\emptyset < 10$  mm).

Estirpe bacteriana	Ø Halo de inibição (mm)						
	Extrato cianobacteriano						
	Hexano (I)	DCM:MeOH (2:1) (I)	MeOH (I)	H <sub>2</sub> O (I)	Hexano (II)	DCM:MeOH (2:1) (II)	MeOH (II)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	LMECYA 088 (11 mm)	SAG 85.79 (11 mm) LMECYA 330 (11 mm)	SAG 85.79 (11 mm)	-	-	LMECYA 330 (16 mm) LMECYA 161 (*)	LMECYA 009 (*) SAG 85.79 (*) SAG 42.87 (12,5 mm)
<i>Staphylococcus aureus</i> URRA 872	-	-	-	-	-	-	SAG 85.79 (*)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> URRA 958	-	LMECYA 290 (*)	-	LMECYA 127 (*)	LMECYA 290 (*)	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	LMECYA 088 (*) LMECYA 079 (*) LMECYA 009 (*) SAG 42.87 (*) SAG 85.79 (*) LMECYA 127 (*) LMECYA 180 (*) LMECYA 145 (*) LMECYA 161 (*) LMECYA 236 (*) LMECYA 290 (*) LMECYA 050 (*)	LMECYA 088 (*) LMECYA 079 (*) LMECYA 009 (*) SAG 42.87 (*) SAG 85.79 (*) LMECYA 127 (*) LMECYA 145 (*) LMECYA 161 (*) LMECYA 290 (*)	LMECYA 088 (*) LMECYA 079 (*) SAG 42.87 (*) SAG 85.79 (*) LMECYA 127 (*) LMECYA 180 (*) LMECYA 330 (*) LMECYA 145 (*)	LMECYA 088 (*) SAG 42.87 (*) SAG 85.79 (*) LMECYA 127 (*) LMECYA 180 (*) LMECYA 145 (*) LMECYA 236 (*) LMECYA 290 (*)	LMECYA 161 (*) LMECYA 236 (*) LMECYA 290 (*) LMECYA 256 (*)	LMECYA 145 (*) LMECYA 161 (*) LMECYA 236 (*) LMECYA 290 (*) LMECYA 050 (*) LMECYA 256 (*)	LMECYA 236 (*) LMECYA 290 (*) LMECYA 050 (*) LMECYA 256 (*) LMECYA 257 (*)

De todas as bactérias patogênicas testadas, somente as estirpes *Staphylococcus aureus* URRA 872, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus epidermidis* URRA 958 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 apresentaram alguma resposta aos extratos das cianobactérias em avaliação. Salienta-se, porém, que os halos de inibição do crescimento formados foram muito ligeiros e que não corresponderam a uma inibição total de crescimento, pois na zona do halo foi observada a presença de colônias, ainda que em muito menor concentração do que na zona exterior ao halo. Considerou-se, portanto, corresponderem a halos de redução do crescimento e não de inibição total do crescimento. Apenas foram considerados significativos os halos com  $\varnothing > 10$  mm, o que somente foi observado com a estirpe *P. aeruginosa* ATCC 27853, tal como indicado a negrito na Tabela 4.1. Os resultados foram confirmados em triplicado e em duas experiências independentes, tal como se exemplifica na Figura 4.3.

Tal como esperado, o DMSO 25% não apresentou efeito inibitório no crescimento da *P. aeruginosa* ATCC 27853 em ambas as avaliações, ao passo que o imipenem, antibiótico de referência, apresentou halos de inibição de 28 mm (Figura 4.3, A) e de 27 mm (Figura 4.3, B), de acordo com o valor expectável para esta espécie [142]. Verificou-se um decréscimo do crescimento da *P. aeruginosa* em todos os extratos de todas as placas, todavia no disco E6 com o extrato de diclorometano:metanol (II) de *Nostoc* sp. (LMECYA 330) esse decréscimo foi mais acentuado, para as três placas, em cada uma das avaliações.

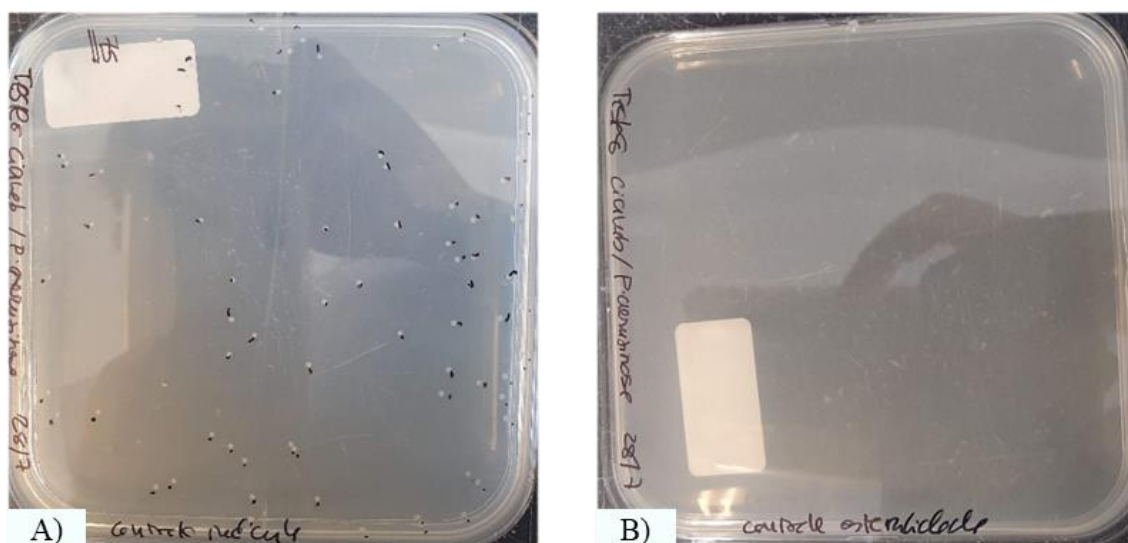


**Figura 4.3** - Avaliação do efeito de extratos cianobacterianos na estirpe *P. aeruginosa* ATCC 27853.(A) Experiência 1; (B) Experiência 2; Extrato E1 – Hexano (I) / *Aph. flos-aquae* (LMECYA 088); E2 – MeOH (II) / *O. limosa* (SAG 42.87); E3 – DCM:MeOH (2:1) (I) / *A. platensis* (SAG 85.79); E4 – MeOH (I) / *A. platensis* (SAG 85.79); E5 – DCM:MeOH (2:1) (I) / *Nostoc* sp. (LMECYA 330); E6 – DCM:MeOH (2:1) (II) / *Nostoc* sp. (LMECYA 330); CN – DMSO 25%; CP – imipenem. As setas indicam a redução acentuada do crescimento bacteriano na presença do extrato de diclorometano:metanol (2:1) (II) da cianobactéria *Nostoc* sp. (LMECYA 330).

#### 4.4 Concentração Inibitória Mínima dos extratos cianobacterianos

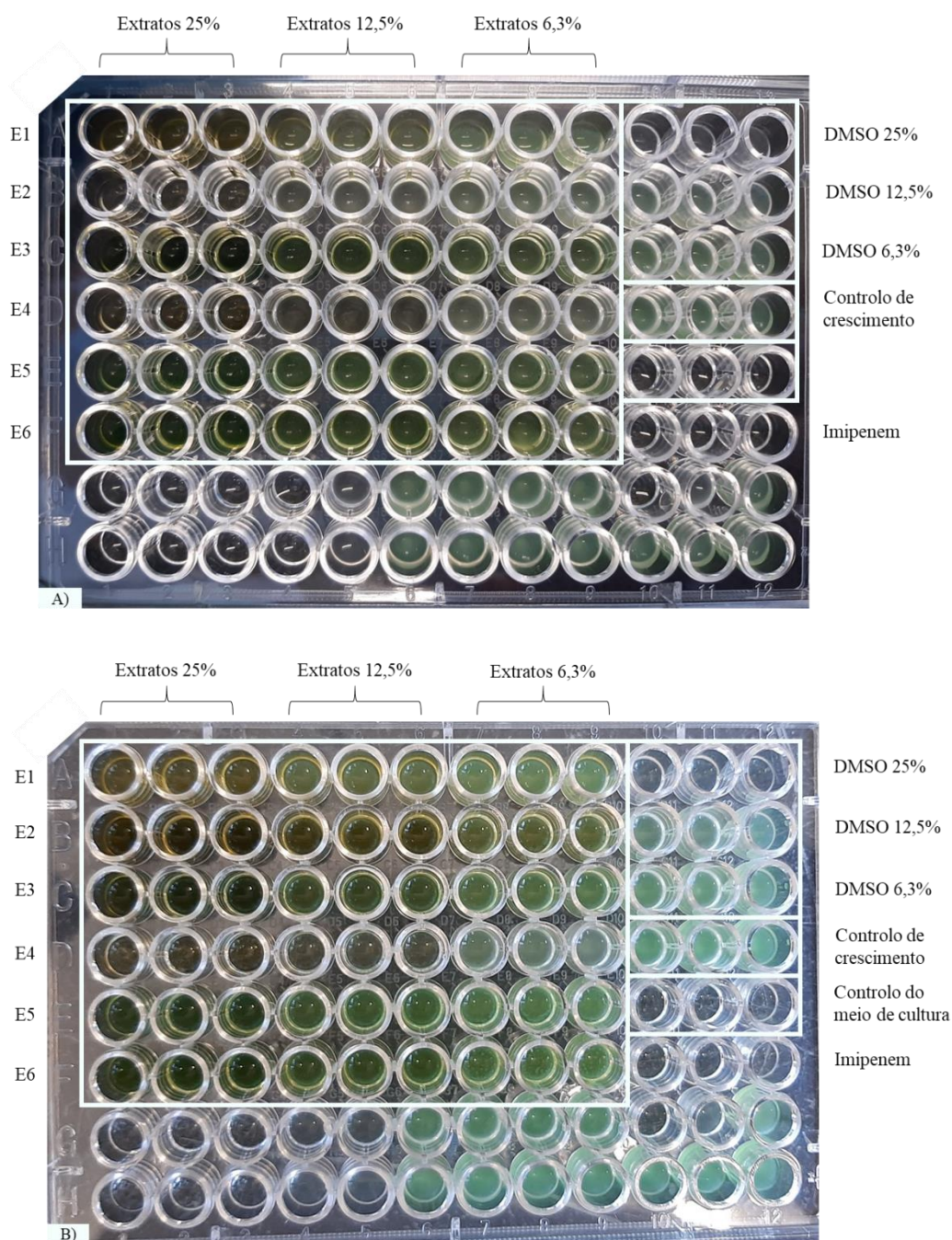
Para confirmar os efeitos observados pelo teste da difusão em disco procedeu-se à determinação da CIM dos extratos E1, E2, E3, E4, E5 e E6 na estirpe *P. aeruginosa* ATCC 27853, através do método da microdiluição, conforme referido no ponto 3.7 e no protocolo descrito no anexo IV.

Na Figura 4.4, estão representados os controlos de crescimento da estirpe *P. aeruginosa* ATCC 27853 e de esterilidade do meio MHB. No controlo de crescimento foi possível verificar que ocorreu crescimento da bactéria de acordo com o esperado, pela formação de 75 colónias. Relativamente ao controlo de esterilidade do meio MHB, observou-se ausência de contaminação microbiana, o que assegura que o teste foi realizado de acordo com as condições de inoculação adequadas.



**Figura 4.4** - Controlo do inóculo (A) e controlo da esterilidade do crescimento (B) em placas de meio MHA, no ensaio da microdiluição em *P. aeruginosa* ATCC 27853.

A representação esquemática da microplaca de 96 poços usada para realizar o método da microdiluição em *P. aeruginosa* ATCC 27853 com os seis extratos supracitados encontra-se na Figura 3.5 e no anexo IV. Os extratos E1, E2, E3, E4, E5 e E6 foram avaliados em 3 concentrações: 25% v/v, 12,5% v/v e 6,25% v/v, em triplicado e em duas experiências independentes, estando as microplacas respectivas representadas na Figura 4.5.



**Figura 4.5** - Determinação da CIM dos extratos cianobacterianos E1, E2, E3, E4, E5 e E6 em *P. aeruginosa* ATCC 27853 pelo método da microdiluição. A bactéria foi exposta a três concentrações diferentes de cada extrato: 25% v/v (colunas 1-3), 12,5% v/v (colunas 4-6) e 6,25% v/v (colunas 7-9). O teste incluiu o controle do solvente (DMSO 25%, 12,5% e 6,25%, colunas 10, 11 e 12, linhas A, B e C, respectivamente), o controle do crescimento de *P. aeruginosa* ATCC 27853 (colunas 10, 11 e 12, linha D), o controle negativo (colunas 10, 11 e 1, linha E) e o controle positivo (Imipenem, 0,006 – 16 mg/L, colunas 1-9, linhas G-H e colunas 10, 11 e 12, linhas F, G e H). (A) e (B) representam o resultado de duas experiências independentes.

No que diz respeito aos controlos do ensaio da microdiluição efetuados na microplaca, para o controlo de crescimento da bactéria (poços identificados por CC no esquema da microplaca) observou-se crescimento bacteriano e para o controlo do meio MHB (poços identificados por CN no esquema da microplaca) observou-se a ausência de crescimento bacteriano, em ambas as avaliações efetuadas, conforme o esperado. Quanto ao controlo positivo, obteve-se valores de CIM de 2mg/L (Figura 4.5, A) e 4 mg/L (Figura 4.5, B), o que está de acordo com o esperado para esta estirpe [142].

Tal como foi referido no ponto 3.7, neste ensaio o crescimento bacteriano é demonstrado por observação de turvação do meio e depósito bacteriano no fundo do poço da microplaca. Tendo isto em consideração, na primeira avaliação, após análise da microplaca, os poços das colunas 1-3 das linhas B, D e F, com os extratos E2, E4 e E6, respetivamente, na concentração 25% v/v, pareceram apresentar ausência de crescimento de *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Figura 4.5, A). Na segunda experiência, a inibição do crescimento da bactéria pareceu ocorrer apenas nos poços D1-6, com o extrato E4 na concentração 25% v/v (colunas 1-3) e 12,5% v/v (colunas 4-6).

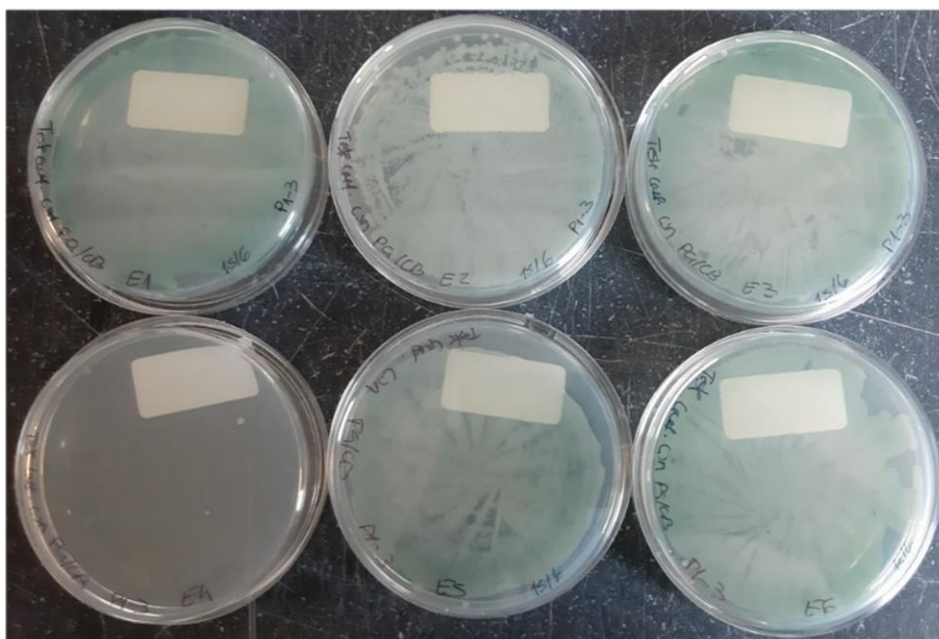
No entanto, como a coloração final verde do meio presente nos poços tanto podia corresponder aos pigmentos dos extratos cianobacterianos como também podia ser indicativa do crescimento de *P. aeruginosa* ATCC 27853, este facto não facilitou a análise das microplacas e os resultados tiveram de ser conferidos. Assim, procedeu-se à observação dos poços das microplacas ao microscópio ótico, a 400x e 1000x, o que permitiu demonstrar a ausência ou presença de crescimento da estirpe bacteriana, como ainda possibilitou analisar a morfologia das células bacterianas.

Desta forma, na primeira avaliação, verificou-se que os poços das colunas 1-3 das linhas A, C, E e F, com os extratos E1, E3, E5 e E6 na concentração 25% v/v, apresentaram uma densidade celular inferior ao do controlo de crescimento e bastonetes morfologicamente diferentes dos observados com o controlo, na medida em que eram mais alongados, pequenos e pouco móveis. Já os poços das colunas 1-3 das linhas B e D, com os extratos E2 e E4, extrato metanólico (II) de *O. limosa* (SAG 42.87) e extrato metanólico (I) de *A. platensis* (SAG 85.79), pareciam não apresentar crescimento da bactéria.

Por seu turno, na segunda avaliação verificou-se que os poços das colunas 1-3 das linhas A-C e os poços das colunas 4-6 da linha D apresentaram baixa densidade celular, com bastonetes alongados, pequenos e pouco viáveis. Nos poços das colunas 1-3 das linhas D e F, com os extratos E4, e E6, extrato metanólico (I) de *A. platensis* (SAG 85.79) e extrato de diclorometano:metanol (II) de *Nostoc* sp. (LMECYA 330) pareceu não haver crescimento de *P. aeruginosa* ATCC 27853.

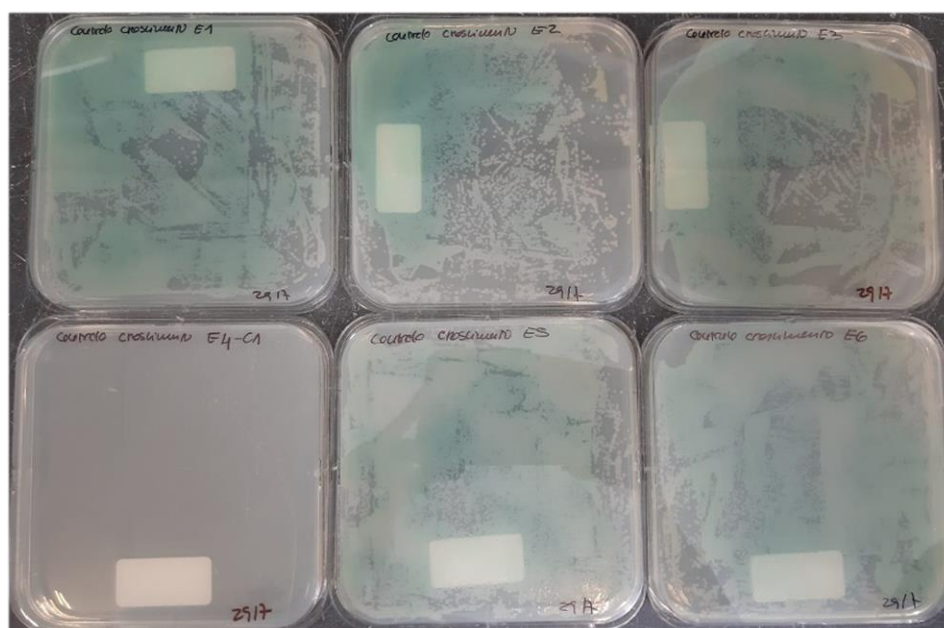
Para além da observação ao microscópio ótico, realizou-se a inoculação do conteúdo dos poços da microplaca em meio sólido (gelose simples na primeira avaliação e meio MHA na segunda avaliação). Este procedimento possibilitou a validação dos resultados observados a olho nu na microplaca e ao microscópio ótico.

Assim, na primeira avaliação foi inoculada uma placa de gelose simples com um *pool* de 33 µL dos poços das colunas 1-3, para cada um dos extratos E1, E2, E3, E4, E5 e E6. Após o período de incubação ( $18 \pm 2$  h) e análise das placas, verificou-se o crescimento da estirpe *P. aeruginosa* ATCC 27853 em todas as placas, salvo na placa correspondente ao extrato E4, extrato metanólico (I) de *A. platensis* (SAG 85.79), na qual não se observou qualquer crescimento bacteriano (Figura 4.6).



**Figura 4.6** - Placas de Petri com meio gelose simples inoculadas com alíquotas dos poços 1-3 com os extratos E1, E2, E3, E4, E5 e E6, das microplacas usadas no teste de determinação da CIM em *P. aeruginosa* ATCC 27853. Cada placa foi identificada com o extrato correspondente.

Relativamente à segunda avaliação, retirou-se dos mesmos poços das colunas 1-3 alíquotas de 10  $\mu$ L, e de seguida fez-se uma diluição de 1:1000 das alíquotas em meio MHB para cada extrato, de modo a poder-se distinguir eventuais diferenças entre as placas. Inoculou-se 100  $\mu$ L da solução diluída de cada extrato em placas com meio MHA. Nesta avaliação, também se inoculou os poços da coluna 10 das linhas A-C, com o controlo do solvente (DMSO 25%), de modo a comparar os resultados. Desta forma, após análise das placas inoculadas, confirmou-se que as células bacterianas estavam inviáveis e portanto que o extrato E4, extrato metanólico (I) de *A. platensis* (SAG 85.79) inibiu totalmente o crescimento da estirpe *P. aeruginosa* ATCC 27853, pelo teste da microdiluição (Figura 4.7).



**Figura 4.7** - Placas quadradas de meio MHA inoculadas com alíquotas dos poços 1-3 com os extratos E1, E2, E3, E4, E5 e E6. Cada placa foi identificada com o extrato correspondente.

#### 4.5 Análise da atividade adjuvante dos extratos de cianobactérias

Dado que no ensaio da difusão em disco apenas se observou efeito significativo ( $\emptyset$  halo de inibição > 10 mm) de alguns extratos na estirpe *P. aeruginosa* ATCC 27853, isto é, apenas esta estirpe se revelou suscetível aos extratos, determinou-se que o próximo passo seria avaliar a existência de um efeito adjuvante desses extratos nos antibióticos para os quais a suscetibilidade da bactéria em questão é conhecida. Para tal, efetuou-se a comparação entre o efeito exclusivo dos antibióticos referidos no crescimento da estirpe bacteriana, e o efeito desses mesmos antibióticos quando adicionados de extratos cianobacterianos, nomeadamente os seis extratos mencionados no ponto anterior (que produziram halos com  $\emptyset > 10$  mm). A avaliação do efeito no crescimento da bactéria foi realizada através do método da Difusão em Disco (TSA).

Os resultados obtidos para este ensaio são apresentados na Tabela 4.2. Os valores obtidos para o TSA dos antibióticos de referência (controlo positivo) e o TSA dos antibióticos de referência com o DMSO a 25% (controlo negativo) estavam de acordo com os *breakpoints* estabelecidos pelo EUCAST para a *P. aeruginosa* ATCC 27853 (“Bp S” e “Bp R” da Tabela 4.2). Assim, os valores obtidos para cada um dos extratos avaliados foram comparados com os valores obtidos para o TSA com o DMSO a 25%, solvente usado na dissolução dos extratos.

**Tabela 4.2** - Resultados da análise da atividade adjuvante de 6 extratos cianobacterianos (E1, E2, E3, E4, E5 e E6) em 16 antibióticos de referência para a estirpe *P. aeruginosa* ATCC 27853. Os *breakpoints* (Bp) correspondem ao intervalo de valores de referência dos halos de inibição, estabelecidos pelo EUCAST, para cada antibiótico em *P. aeruginosa* ATCC 27853. (Bp S) Intervalo de valores dos halos de inibição para os quais a estirpe é considerada suscetível. (Bp R) Intervalo de valores dos halos de inibição para os quais a estirpe *P. aeruginosa* ATCC 27853 é considerada resistente. (EI) Evidência insuficiente quanto à eficácia do antibiótico. (RN) Resistência natural da estirpe ao antibiótico. A amarelo assinala-se o efeito estimulatório dos extratos de cianobactérias na atividade do antibiótico, e a verde o efeito inibitório.

Antibiótico	$\emptyset$ Halo de inibição (mm)									
	Bp S	Bp R	TSA	DMSO 25%	E1	E2	E3	E4	E5	E6
Ciprofloxacina (5 $\mu$ g)	>=50	<26	32	33	36	33	33	33	33	32
Tobramicina (10 $\mu$ g)	>=18	<18	28	25	24	25	24	25	23	25
Gentamicina (10 $\mu$ g)	EI	EI	20	21	20	21	21	21	19	20
Amicacina (30 $\mu$ g)	>=15	<15	24	26	25	25	25	25	25	24
Levofloxacina (5 $\mu$ g)	>=50	<22	23	24	26	26	24	25	24	25
Ceftazidima (30 $\mu$ g) + Ácido Clavulânico (10 $\mu$ g)	-	-	26	26	28	26	27	26	25	29
Ceftazidima (30 $\mu$ g)	-	-	28	31	31	29	30	30	29	29
Netilmicina (10 $\mu$ g)	EI	EI	19	19	20	19	18	19	19	18
Cefepima (30 $\mu$ g)	>=50	<21	31	32	32	32	30	30	32	33
Doripenem (10 $\mu$ g)	-	-	35	36	36	36	36	34	34	35
Imipenem (10 $\mu$ g)	>=50	<20	28	29	29	28	23	22	28	29
Ceftazidima (10 $\mu$ g)	>=50	<17	26	26	24	27	26	25	26	25
Piperaciclina (30 $\mu$ g) + Tazobactam (6 $\mu$ g)	>=50	<18	26	23	27	27	26	29	27	28
Meropenem (10 $\mu$ g)	>=24	<18	30	32	32	31	30	32	30	32
Ertapenem (10 $\mu$ g)	RN	RN	22	20	23	22	21	19	27	22
Aztreonam (30 $\mu$ g)	>=50	<18	29	27	31	33	32	33	34	32

Como se concluiu pela Tabela 4.2, os 6 extratos cianobacterianos potenciaram a atividade do antibiótico aztraeonam na estirpe *P. aeruginosa* ATCC 27853, uma vez que a adição dos extratos induziu o aumento do halo de inibição desse antibiótico em pelo menos 4 mm. De semelhante modo, todos os extratos potenciaram a eficácia antibacteriana da associação entre a piperaciclina e o tazobactam, à exceção do extrato de diclorometano:metanol (I) de *A. platensis* (SAG 85.79). Adicionalmente, o extrato de diclorometano:metanol (I) de *Nostoc* sp. (LMECYA 330) potenciou o antibiótico ertapenem (ERT). Em contrapartida, verificou-se que o extrato de diclorometano:metanol (I) e o extrato metanólico (I) de *A. platensis* (SAG 85.79) reduziram a atividade antibacteriana do imipenem.

## 5 Discussão

Com este trabalho pretendia-se avaliar o efeito de extratos de cianobactérias no crescimento de estirpes bacterianas de interesse clínico. Para tal, realizou-se a produção de extratos de vinte e cinco estirpes de cianobactérias mantidas na coleção de culturas de microalgas ESSACC e avaliou-se o fenótipo de suscetibilidade de nove bactérias patogénicas em relação a esses extratos. As estirpes de cianobactérias analisadas pertencem aos géneros *Aphanizomenon*, *Arthrospira*, *Dolichospermum*, *Leptolyngbya*, *Limnothrix*, *Microcystis*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Planktothrix*, *Raphidiopsis* e *Synechococcus*. Na literatura, já é conhecida a produção de compostos bioativos com propriedades antibacterianas por várias estirpes destes géneros [58,80,83,99,105]. Por seu turno, as estirpes bacterianas testadas foram *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Enterococcus faecalis*. De semelhante modo, para algumas destas estirpes, a atividade antibacteriana de extratos cianobacterianos e compostos bioativos isolados de cianobactérias já foi reportada [70–72,74].

Neste estudo, das nove estirpes bacterianas analisadas somente se verificou efeito significativo ( $\emptyset > 10$  mm) na estirpe *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Por sua vez, das vinte e cinco estirpes de cianobactérias avaliadas apenas quatro tiveram efeito, nomeadamente *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088), *Oscillatoria limosa* (SAG 42.87), *Arthrospira platensis* (SAG 85.79) e *Nostoc* sp. (LMECYA 330).

### 5.1 Produção e extração da biomassa das estirpes de cianobactérias

Tal como referido no ponto 4.1, o rendimento relativo à produção de biomassa variou entre as estirpes de cianobactérias. De facto, a obtenção de quantidades insuficientes de biomassa é uma das limitações encontradas nos processos de produção de compostos bioativos naturais, e apesar de as cianobactérias serem relativamente fáceis de cultivar em condições laboratoriais, é difícil obter quantidades significativas de biomassa e de compostos bioativos [82]. Neste estudo, a produção insuficiente de biomassa comprometeu o passo seguinte, a extração da biomassa com solventes, na medida em que o objetivo inicial era realizar as duas sequências de extração, (I) e (II), para todas as estirpes de cianobactérias, e isto apenas foi possível para quinze das vinte e cinco estirpes avaliadas.

Por outro lado, o facto de não se ter verificado atividade antibacteriana em muitos dos extratos cianobacterianos pode também dever-se à quantidade insuficiente de biomassa, uma vez que os compostos bioativos com propriedades antibacterianas de interesse presentes nos extratos podem estar muito diluídos. Melhorar as técnicas de cultura de cianobactérias, através da inoculação das estirpes em biorreatores de elevada capacidade, ou pela alteração das condições abióticas a que estão expostas em laboratório, de modo a que estas se assemelhem às condições a que as estirpes estão habitualmente expostas no meio ambiente, pode permitir a obtenção de rendimentos de biomassa mais elevados, e como tal aumentar a atividade dos extratos das cianobactérias [17,67,71,144].

A extração da biomassa foi realizada de forma sequencial, partindo sempre da mesma biomassa e aplicando sucessivamente cada um dos solventes hexano, diclorometano:metanol (2:1), metanol a 70% e água. Apesar de na literatura a sequência de extração dos compostos bioativos ocorrer frequentemente do menos polar para o mais polar [139–141], neste estudo optou-se por efetuar a extração dos compostos de acordo com as sequências de extração: (I) polaridade crescente dos solventes e (II) polaridade decrescente dos solventes [excetuando as dez estirpes acima mencionadas, cuja biomassa foi extraída apenas através da sequência de extração (I)]. Efetivamente, o tipo de

extração e de solventes usados parece influenciar a atividade dos extratos cianobacterianos, extraindo compostos com propriedades químicas diferentes e, conseqüentemente, bioatividades diferentes. Analisando os resultados, verificou-se que o número de extratos cianobacterianos com efeito mais pronunciado obtidos através da sequência de extração (I) foi superior ao dos obtidos pela sequência (II). Por outro lado, nenhum dos extratos aquosos teve efeito nas bactérias avaliadas.

Na literatura, os solventes mais usados na extração de compostos bioativos em cianobactérias são o metanol, o clorofórmio, o acetato de etilo, o hexano, o etanol, a acetona e o butanol [9,17,40,44,104]. Porém a maioria destes solventes são tóxicos, o que pode inviabilizar a sua aplicação a nível industrial [90,145,146], designadamente o hexano e o metanol [127–129]. Assim, será mais adequado usar misturas aquosas de solventes, tais como o metanol e o etanol, visto serem menos tóxicas e poderem ser aplicadas a nível industrial. Atualmente existe um conjunto de procedimentos de extração alternativos que, entre outras particularidades, não incluem a utilização de solventes [90,145–147]. Alguns destes procedimentos são:

- Extração por fluídos supercríticos (*Supercritical fluid extraction*, SFE) – processo de separação de compostos dissolvidos de uma matriz através de fluídos de substâncias gasosas que se encontram em condições de pressão e temperatura acima dos seus parâmetros críticos;
- Extração por líquidos pressurizados (*Pressurized liquid extraction*, PLE) - processo de separação de compostos dissolvidos de uma matriz através de líquidos, sob condições de temperatura elevada e pressão atmosférica;
- (*Subcritical water extraction*, SWE) – processo de extração de compostos pouco polares através da utilização de água;
- Micro-ondas (*Microwave-assisted extraction*, MAE) – processo de extração de compostos através de ondas eletromagnéticas (micro-ondas), indutoras do aumento da temperatura, e conseqüentemente, de maior solubilidade dos compostos;
- Campo elétrico pulsado (*Pulsed electric field assisted extraction*, PEF) – processo de extração de compostos por aplicação de pulsos elétricos curtos, por forma a induzir poros na estrutura da membrana celular do organismo;
- Enzimas (*Enzyme-assisted extraction*, EAE) – processo de extração de compostos através da utilização de um ou vários enzimas, tais como as pectinases e as celulases, de modo a promover a hidrólise de componentes resistentes, como por exemplo a parede celular de organismos [90,145–147].

Estas técnicas são caracterizadas por requererem curtos períodos de operação, com taxas de extração de compostos rentáveis [90,147]. De todas, a SFE é considerada a técnica com maior potencial de aplicação a uma escala industrial, na medida em que o CO<sub>2</sub> é o solvente mais usado durante o processo de extração [90,147].

Deste modo, e considerando que os processos de produção de biomassa e de extração de compostos bioativos interferem com a atividade dos extratos de cianobactérias, em estudos futuros com as estirpes da ESSACC deverá recorrer-se a procedimentos alternativos e partir de uma maior quantidade de biomassa. A otimização destes processos poderá permitir observar um efeito mais acentuado dos extratos avaliados e confirmar o seu potencial antibacteriano, designadamente das estirpes com as quais pareceu não existir efeito, e numa gama mais alargada de bactérias alvo.

## 5.2 Atividade antibacteriana dos extratos cianobacterianos

O fenótipo de suscetibilidade das estirpes de bactérias patogénicas aos extratos das cianobactérias foi, numa primeira fase, avaliado através do método da difusão em disco. Das nove estirpes bacterianas analisadas apenas foi considerado efeito significativo ( $\emptyset$  halo de inibição > 10 mm) na estirpe *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, pelas cianobactérias *Aphanizomenon flos-aquae* (LMECYA 088), *Oscillatoria limosa* (SAG 42.87), *Arthrospira platensis* (SAG 85.79) e *Nostoc* sp. (LMECYA 330). Contudo, apesar de se ter observado o efeito mencionado, neste teste os extratos não induziram inibição total do crescimento de *P. aeruginosa* ATCC 27853, dado que apenas houve redução do crescimento da estirpe. Numa segunda fase de avaliação da atividade antibacteriana, realizou-se o método da microdiluição com os extratos que tiveram efeito significativo na *P. aeruginosa* ATCC 27853. Embora no método da difusão em disco se tenha observado que o decréscimo do crescimento de *P. aeruginosa* ATCC 27853 foi mais acentuado na presença do extrato de diclorometano:metanol (II) de *Nostoc* sp. (LMECYA 330), no ensaio da microdiluição o extrato metanólico (I) de *A. platensis* (SAG 85.79) foi o único que inibiu totalmente o crescimento da bactéria.

Esta diferença entre os resultados dos dois métodos pode dever-se ao facto de os compostos bioativos com propriedades antibacterianas presentes nos diferentes extratos analisados atuarem de modo diferente no organismo bacteriano. Através da observação microscópica da microplaca (teste da microdiluição), verificou-se que, na concentração 25% v/v, tanto o extrato de diclorometano:metanol (II) de *Nostoc* sp. (LMECYA 330), como também os extratos de hexano (I) de *A. flos-aquae* (LMECYA 088), de diclorometano:metanol (I) de *A. platensis* (SAG 85.79) e de *Nostoc* sp. (LMECYA 330), pareceram provocar uma diminuição da densidade celular da estirpe *P. aeruginosa* ATCC 27853, e induzir a alteração da morfologia típica das células da bactéria (bastonetes mais pequenos e alongados, comparativamente aos bastonetes visualizados no controlo de crescimento). Ou seja, os compostos presentes nestes extratos podem ter apresentado atividade bacteriostática e interferido ou inibido a replicação das bactérias, ao passo que os compostos presentes no extrato metanólico (I) de *A. platensis* (SAG 85.79) podem ter apresentado atividade bactericida e causado diretamente a morte da bactéria [1,12].

Por outro lado, a diferença entre os testes pode estar relacionada com a quantidade de extrato aplicado. No teste da difusão em disco foram aplicados 10  $\mu$ L de extrato cianobacteriano, enquanto no teste da microdiluição foram avaliadas três quantidades diferentes na microplaca, correspondendo a 25  $\mu$ L, 12,5  $\mu$ L e 6,25  $\mu$ L. No teste da microdiluição os extratos cianobacterianos correspondentes a 12,5  $\mu$ L não tiveram qualquer efeito no crescimento da bactéria, e esta concentração de extrato aproxima-se da quantidade de extrato que foi aplicado no teste da difusão em disco. Porém, o extrato metanólico (I) de *A. platensis* (SAG 85.79) numa quantidade mais elevada (25  $\mu$ L) do que no teste da difusão (10  $\mu$ L) inibiu o crescimento da estirpe bacteriana mencionada. Ou seja, o facto de o extrato estar mais concentrado num teste (microdiluição) do que no outro (difusão em disco) pode ter influenciado a atividade antibacteriana dos compostos bioativos que continha.

Na literatura, o método da difusão em disco e o método da microdiluição são as técnicas mais utilizadas na avaliação das propriedades antibacterianas de extratos naturais, sendo que por norma o método da microdiluição só é utilizado em extratos que tenham apresentado atividade no método da difusão em disco [100,104,125]. Assim, neste trabalho, seria esperado observar pelo método da microdiluição a inibição do crescimento de *P. aeruginosa* ATCC 27853 com o extrato de diclorometano:metanol (II) de *Nostoc* sp. (LMECYA 330), que foi o extrato que produziu um efeito mais acentuado pelo método da difusão em disco. Contudo, o crescimento da bactéria apenas foi inibido na presença do extrato metanólico (I) de *A. platensis* (SAG 85.79), que não tinha produzido

um efeito tão evidente no teste da difusão em disco. Estes resultados sugerem que apesar de no teste da difusão em disco não se ter verificado efeito dos restantes extratos avaliados, tanto em *P. aeruginosa* ATCC 27853 como nas outras estirpes bacterianas, as propriedades antibacterianas dos mesmos poderiam ser evidenciadas no teste da microdiluição. A ausência de formação de halo de inibição no teste da difusão em disco pode ser apenas indicativa de que não ocorreu difusão completa do extrato ao longo do disco, sem ser necessariamente indicativa de inatividade do extrato, tal como já foi reportado noutros estudos [148].

Em estudos futuros com as estirpes cianobacterianas, deveria ser ponderada a hipótese de realizar o teste da microdiluição para todos os extratos de cianobactérias e estirpes bacterianas, até porque este possibilita a obtenção de dados semiquantitativos, podendo ser realmente o método mais apropriado para analisar e determinar a atividade antibacteriana de extratos naturais. Contudo, para além destes métodos, existem outras técnicas alternativas eficazes na avaliação de extratos naturais, tais como método turbidimétrico em MHB, que é uma medida da contagem total de células bacterianas, incluindo células vivas e as células mortas, e o método de difusão em agar por *Pour Plate* que, por sua vez, indica a contagem de células viáveis em torno de poços em placas de agar [148,149].

Neste trabalho, as estirpes *Nostoc* sp. (LMECYA 330) e *A. platensis* (SAG 85.79) foram as cianobactérias que tiveram efeito mais pronunciado numa das estirpes de bactérias patogénicas, apesar de apenas a estirpe *A. platensis* (SAG 85.79) ter efetivamente inibido o crescimento de *P. aeruginosa* ATCC 27853. Na literatura já foi reportado o efeito antibacteriano de um composto isolado da espécie *Nostoc* sp., o *noscomin*, contra *P. aeruginosa* [17,40,44,72]. Recentemente, foram ainda identificados outros compostos produzidos por *Nostoc* sp. contra *P. aeruginosa*, os *nostocyclopeptides* [14]. De facto, algumas espécies cianobacterianas do género *Nostoc* são bastante conhecidas pela produção prolífica de diversos compostos bioativos com propriedades antibacterianas, tais como carbamida ciclofanos (A-L), *cybastacines* (A e B) e *nostocyclin* A, que evidenciaram ser ativos contra estirpes bacterianas Gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis* e *Bacillus subtilis* [17,40,72,77,104,123,150]. Por sua vez, embora também seja conhecida a produção de compostos com propriedades antibacterianas por *A. platensis*, até há data poucos foram isolados desta espécie. A ficocianina C é um pigmento produzido pela *A. platensis* que já teve efeito antibacteriano não só em *P. aeruginosa*, como também em *E. coli* e em *S. aureus* resistente à metilina [124].

Os resultados obtidos neste trabalho com a estirpe *P. aeruginosa* ATCC 27853 têm particular relevância, tendo em conta que se trata de uma bactéria Gram negativa ubíqua e capaz de se adaptar a diversas condições ambientais, e que em contexto clínico está frequentemente associada a múltiplas doenças infecciosas [151,152]. Atualmente, esta bactéria é um dos principais agentes patogénicos a causar infeções severas, principalmente em pacientes imunocomprometidos [151–153]. Isto deve-se não só ao facto de esta bactéria ser produtora de biofilme, como também ao facto de ter vindo a desenvolver diversos mecanismos de resistência a antibióticos [152,153]. Neste momento, diversas espécies do género *Pseudomonas* são resistentes à maioria das classes de antibióticos, o que representa uma adversidade no tratamento das doenças infecciosas causadas por esta bactéria [153]. Assim, tendo em conta a necessidade de desenvolver antibióticos eficazes contra *P. aeruginosa*, a produção de antibióticos a partir organismos naturais como as cianobactérias *Nostoc* sp. e *A. platensis* pode ser uma forma de mitigar o cenário de resistência observado para esta estirpe bacteriana [152]. Neste sentido, estas estirpes de cianobactérias, e até outras avaliadas neste trabalho, podem vir a ser testadas noutras estirpes clínicas de *P. aeruginosa*, em mais estirpes da mesma espécie *P. aeruginosa* e ainda noutras espécies do género *Pseudomonas*.

Tal como já foi referido, a espécie *P. aeruginosa* pertence a um grupo de bactérias Gram negativas multirresistentes, denominado ESKAPE, que têm estado envolvidas no aparecimento e propagação de determinadas infeções nosocomiais de difícil tratamento [2,20]. Muitos dos compostos naturais produzidos por cianobactérias que já foram identificados demonstraram ter efeito antibacteriano contra algumas estirpes destas espécies [154]. Num estudo que avaliou o potencial de extratos obtidos a partir de diferentes solventes na cianobactéria *Oxynema thaianum*, verificou-se atividade antibacteriana de extratos de clorofórmio em estirpes de *E. coli* e *K. pneumoniae*, estirpes ESKAPE que parecem apresentar mecanismos eficientes de resistência a antibióticos da classe dos  $\beta$ -lactâmicos [154].

A espécie *Fischerella ambigua* é uma das principais cianobactérias responsáveis pela síntese de compostos antibacterianos, que demonstraram ter atividade não só em estirpes Gram negativas, como também em estirpes Gram positivas [17,72,108,114,115,117]. Alguns destes compostos são o *ambigol* A, *tjipanazole* D, *ambiguines* (G e H), *hapalindoles* (H e I) e *fischambiguine* B [17,72,108,114,115,117]. Em estirpes cianobacterianas da espécie *Lyngbya* sp. também já foram identificados diversos compostos como o *malyngolide*, *pahayokolide* A, *lagunamides* (A e B), *pitipeptolides* (A e B) e *lyngbyazothrins* (A-D), com efeito antibacteriano em bactérias como *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis* e *E. coli* [17,44,72,104,106]. Para além das cianobactérias já referidas, também em espécies dos géneros *Hapalosiphon*, *Hormoscilla*, *Westiellopsis* e *Cylindrospermum*, foram identificados grande parte dos compostos cianobacterianos com atividade antibacteriana [72]. Assim, em estudos futuros poderia alargar-se o espólio das estirpes ESSACC a estas espécies, bem como avaliar mais estirpes de bactérias, como *B. subtilis* e *K. pneumoniae*.

### 5.3 Atividade adjuvante dos extratos cianobacterianos

Este trabalho também teve como objetivo verificar se os extratos que tiveram efeito significativo ( $\emptyset$  halo de inibição > 10 mm) em *P. aeruginosa* ATCC 27853 apresentam atividade adjuvante de antibióticos de referência para esta estirpe bacteriana. Para tal, efetuou-se a comparação entre o efeito exclusivo dos antibióticos de referência com o efeito dos mesmos antibióticos adicionados daqueles extratos. Todos os extratos, nomeadamente o extrato de hexano (I) de *A. flos-aquae* (LMACYA 088), o extrato metanólico (II) de *O. limosa* (SAG 42.87), os extratos de diclorometano:metanol (I) e extrato metanólico (I) de *A. platensis* (SAG 85.79), e os extratos de diclorometano:metanol (I) e (II) de *Nostoc* sp. (LMACYA 330) potenciaram a atividade do antibiótico AZT. De semelhante modo, verificou-se que, excetuando o extrato de diclorometano:metanol (I) de *A. platensis* (SAG 85.79), todos os extratos potenciaram a eficácia antibacteriana da associação de penicilinas PIP/TAZ. Adicionalmente, o extrato de diclorometano:metanol (I) de *Nostoc* sp. (LMACYA 330) potenciou o antibiótico ERT. Deste modo, é possível concluir que extratos produzidos pelas cianobactérias *A. flos-aquae* (LMACYA 088), *O. limosa* (SAG 42.87), *A. platensis* (SAG 85.79), e *Nostoc* sp. (LMACYA 330) podem ter atividade adjuvante dos antibióticos AZT, PIP/TAZ e ERT.

O AZT e a associação de penicilinas PIP/TAZ pertencem à classe de antibióticos dos  $\beta$ -lactâmicos, mas o AZT está incluído na subclasse dos monobactamas e a associação PIP/TAZ integra a subclasse das penicilinas [2,4,10,18,24]. Mesmo pertencendo a subclasses de antibióticos diferentes, ambos os antibióticos atuam no organismo bacteriano através da inibição da síntese da parede celular [2,4,10,18,24]. O facto dos extratos cianobacterianos terem potenciado a eficácia do AZT e da associação PIP/TAZ sugere que a atividade antibacteriana dos compostos bioativos que os extratos contêm pode manifestar-se através da interferência ou inibição da síntese da parede celular das

bactérias. Por outro lado, o extrato de diclorometano:metanol (I) de *Nostoc* sp. (LMACYA 330) potenciou a atividade do AZT, da associação PIP/TAZ e ainda do antibiótico ERT, que pertence à subclasse dos carbapenemos (classe dos  $\beta$ -lactâmicos). Apesar de apresentarem o mesmo modo de ação, o mecanismo de resistência a estes antibióticos é diferente (ERT – carbapenemases; AZT -  $\beta$ -lactamases de espectro largo; PIP/TAZ -  $\beta$ -lactamases). Assim, este extrato em particular pode, eventualmente, ser um adjuvante de antibióticos eficaz em estirpes com suscetibilidade reduzida ou resistentes aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos [2,4,10].

Na antibioterapia, a combinação de antibióticos favorece a atividade sinérgica entre eles, e tem como propósito a otimização da eficácia da sua atividade antibacteriana contra aos agentes patogénicos [37,51]. Porém, a associação entre antibióticos e compostos com reduzida ou até inexistente atividade antibacteriana é uma estratégia inovadora que tem sido cada vez mais explorada, principalmente no combate ao fenómeno de resistência a antibióticos [25,37,51]. Estes adjuvantes de antibióticos potenciam a atividade antimicrobiana dos antibióticos ao intervirem diretamente em mecanismos de resistência desenvolvidos pelas bactérias patogénicas resistentes, o que pode amplificar o espectro de atividade dos antibióticos [37]. A atividade adjuvante de compostos naturalmente produzidos por diversos organismos já foi reportada [25]. Por outro lado, alguns estudos também já verificaram que a combinação de diferentes extratos que contenham compostos com propriedades antibacterianas pode apresentar atividade sinérgica entre si [31,75]. Esta combinação entre extratos de diferentes cianobactérias também pode vir a ser analisada em estudos futuros de avaliação da atividade antibacteriana de cianobactérias.

Os resultados obtidos podem ser sugestivos quanto aos mecanismos subjacentes à atividade antibacteriana dos compostos bioativos presentes nos extratos das cianobactérias avaliadas. Contudo, para obter informação relativa aos mecanismos de ação destes compostos, é elementar proceder à caracterização química dos extratos [149]. A aplicação de técnicas como a cromatografia líquida de alta eficiência permite determinar a composição destes extratos e auxiliar a identificar as propriedades e mecanismos de ação nas bactérias [149]. No entanto, ainda que a pesquisa de compostos com propriedades antibacterianas tenha aumentado nas últimas, décadas devido à emergência e disseminação de estirpes bacterianas resistente a antibióticos (e respetivos mecanismos de resistência), e muitos destes compostos bioativos já terem sido isolados e identificados, poucos concluíram a etapa de ensaios clínicos e nenhum destes compostos foi aprovado para produção industrial [90,146,152,153]. Isto deve-se principalmente aos processos de extração intensivos que recorrem frequentemente a solventes tóxicos, e que são pouco rentáveis e dispendiosos [146]. Porém se as limitações encontradas na produção de compostos antibacterianos naturais produzidos por cianobactérias forem ultrapassadas, estes compostos podem ter aplicação no desenvolvimento de novos antibióticos.

## 6 Conclusões e Perspetivas Futuras

Em suma, foram cumpridos os objetivos propostos e identificaram-se estirpes de cianobactérias com potencial efeito no crescimento bacteriano, podendo estas estirpes serem promissoras para estudos de compostos antibacterianos naturais. Embora apenas extratos de *A. platensis* (SAG 85.79) tenham inibido totalmente o crescimento da estirpe *P. aeruginosa* ATCC 27853, verificou-se a redução do crescimento desta estirpe e alteração morfológica das respetivas células quando esta bactéria foi exposta a extratos das cianobactérias *A. flos-aquae* (LMECYA 088), *O. limosa* (SAG 42.87) e *Nostoc* sp. (LMECYA 330). Adicionalmente, verificou-se também que alguns extratos destas cianobactérias potenciaram a atividade antibacteriana de antibióticos de referência para a bactéria *P. aeruginosa* ATCC 27853, isto é, evidenciaram atividade adjuvante destes antibióticos. Dado o atual cenário de resistência a antibióticos, que se tem traduzido na perda de eficácia de vários antibióticos e ainda na escassez de novos antibióticos, estes resultados podem ser importantes uma vez que sugerem a hipótese de utilizar componentes destes extratos para, de certo modo, prolongar a atividade de vários antibióticos e até de “reativar” a ação de determinados antibióticos que atualmente possam ser considerados ineficazes.

Ainda que só se tenha verificado efeito significativo de alguns extratos cianobacterianos em *P. aeruginosa* ATCC 27853, estes resultados obtidos para esta estirpe em particular são bastante relevantes, uma vez que esta estirpe tem importância em contexto clínico. Em conjunto com outras estirpes Gram negativas, a bactéria *P. aeruginosa* tem estado associada ao aparecimento de várias infeções hospitalares de difícil tratamento, devido aos mecanismos de resistência eficientes aos principais antibióticos que apresenta. A produção de novos antibióticos eficazes contra esta espécie a partir de compostos naturais sintetizados pelas cianobactérias identificadas pode ser uma alternativa promissora.

Neste estudo, verificou-se que a quantidade de biomassa extraída, o tipo de extração e solvente de extração utilizados, a quantidade de extrato avaliada e o método de avaliação do fenótipo de suscetibilidade das bactérias usado, são fatores que podem influenciar a deteção da potencial atividade antibacteriana dos extratos das cianobactérias. Em ensaios futuros, otimizar as condições de produção e extração da biomassa, avaliar mais estirpes de cianobactérias e testar mais estirpes de bactérias patogénicas, analisar e identificar os mecanismos de ação dos compostos bioativos presentes nos extratos cianobacterianos e, de um modo geral, ultrapassar as limitações encontradas na produção de compostos antibacterianos naturais por cianobactérias, pode impulsionar a utilização destes organismos e seus compostos no desenvolvimento de novos antibióticos.

A produção de antibióticos a partir de extratos de cianobactérias é, efetivamente, bastante promissora, não só pela síntese de compostos bioativos com propriedades antibacterianas por estes microrganismos, mas também pela disponibilidade destes na natureza e pelo fato de requererem condições de crescimento elementares. A avaliação da atividade antibacteriana de compostos cianobacterianos e o desenvolvimento de antibióticos naturais a partir das cianobactérias pode ajudar a mitigar a problemática da dispersão de genes e mecanismos de resistência a antibióticos entre estirpes bacterianas multirresistentes.

## 7 Referências Bibliográficas

1. Silva, A.; Silva, V.; Igrejas, G.; Gaivão, I.; Aires, A.; Klibi, N.; Dapkevicius, M. de L.E.; Valentão, P.; Falco, V.; Poeta, P. Valorization of winemaking by-products as a novel source of antibacterial properties: New strategies to fight antibiotic resistance. *Molecules* **2021**, *26*, doi:10.3390/molecules26082331.
2. González-Bello, C. Antibiotic adjuvants – A strategy to unlock bacterial resistance to antibiotics. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 4221–4228, doi:10.1016/j.bmcl.2017.08.027.
3. Tortorella, E.; Tedesco, P.; Esposito, F.P.; January, G.G.; Fani, R.; Jaspars, M.; De Pascale, D. Antibiotics from deep-sea microorganisms: Current discoveries and perspectives. *Mar. Drugs* **2018**, *16*, 1–16, doi:10.3390/md16100355.
4. Singh, S.B.; Young, K.; Silver, L.L. What is an “ideal” antibiotic? Discovery challenges and path forward. *Biochem. Pharmacol.* **2017**, *133*, 63–73, doi:10.1016/j.bcp.2017.01.003.
5. Friedman, N.D.; Temkin, E.; Carmeli, Y. The negative impact of antibiotic resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* **2016**, *22*, 416–422, doi:10.1016/j.cmi.2015.12.002.
6. Gupta, P.D.; Birdi, T.J. Development of botanicals to combat antibiotic resistance. *J. Ayurveda Integr. Med.* **2017**, *8*, 266–275, doi:10.1016/j.jaim.2017.05.004.
7. Mahajan, G.B.; Balachandran, L. Sources of Antibiotics: Hot springs. *Biochem. Pharmacol.* **2017**, *134*, 35–41, doi:10.1016/j.bcp.2016.11.021.
8. Machowska, A.; Lundborg, C.S. Drivers of irrational use of antibiotics in Europe. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2019**, *16*, doi:10.3390/ijerph16010027.
9. Rojas, V.; Rivas, L.; Cárdenas, C.; Guzmán, F. Cyanobacteria and eukaryotic microalgae as emerging sources of antibacterial peptides. *Molecules* **2020**, *25*, doi:10.3390/molecules25245804.
10. Hutchings, M.; Truman, A.W.; Wilkinson, B. Antibiotics: past, present and future. *Curr. Opin. Microbiol.* **2019**, *51*, 72–80, doi:10.1016/j.mib.2019.10.008.
11. Lewis, K. The Science of Antibiotic Discovery. *Cell* **2020**, *181*, 29–45, doi:10.1016/j.cell.2020.02.056.
12. Nicolaou, K.C.; Rigol, S. A brief history of antibiotics and select advances in their synthesis. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **2018**, *71*, 153–184, doi:10.1038/ja.2017.62.
13. Durand, G.A.; Raoult, D.; Dubourg, G. Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2019**, *53*, 371–382, doi:10.1016/j.ijantimicag.2018.11.010.
14. Nowruzi, B.; Sarvari, G.; Blanco, S. Applications of cyanobacteria in biomedicine; *Elsevier Inc.*, **2020**; ISBN 9780128183052.
15. Genilloud, O. Natural products discovery and potential for new antibiotics. *Curr. Opin. Microbiol.* **2019**, *51*, 81–87, doi:10.1016/j.mib.2019.10.012.
16. Almeida, A.; Duarte, S.; Nunes, R.; Rocha, H.; Pena, A.; Meisel, L. Human and Veterinary Antibiotics Used in Portugal-A Ranking for Ecosurveillance. *Toxics* **2014**, *2*, 188–225, doi:10.3390/toxics2020188.
17. Senhorinho, G.N.A.; Ross, G.M.; Scott, J.A. Cyanobacteria and eukaryotic microalgae as potential sources of antibiotics. *Phycologia* **2015**, *54*, 271–282, doi:10.2216/14-092.1.
18. Peterson, E.; Kaur, P. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1–21, doi:10.3389/fmicb.2018.02928.
19. Safari, M.; Ahmady-Asbchin, S.; Zamanifar, P. In vitro evaluation of antimicrobial activities

- from aqueous and methanolic extracts of cyanobacteria. *Eur. J. Biol. Res.* **2019**, *9*, 184–192.
20. Almakki, A.; Jumas-Bilak, E.; Marchandin, H.; Licznar-Fajardo, P. Antibiotic resistance in urban runoff. *Sci. Total Environ.* **2019**, *667*, 64–76, doi:10.1016/j.scitotenv.2019.02.183.
  21. Bologna, C.G.; Ursu, O.; Oprea, T.I.; Melançon, C.E.; Tegos, G.P. Emerging trends in the discovery of natural product antibacterials. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2013**, *13*, 678–687, doi:10.1016/j.coph.2013.07.002.
  22. Wencewicz, T.A. Crossroads of Antibiotic Resistance and Biosynthesis. *J. Mol. Biol.* **2019**, *431*, 3370–3399, doi:10.1016/j.jmb.2019.06.033.
  23. Holmes, A.H.; Moore, L.S.P.; Sundsfjord, A.; Steinbakk, M.; Regmi, S.; Karkey, A.; Guerin, P.J.; Piddock, L.J.V. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *Lancet* **2016**, *387*, 176–187, doi:10.1016/S0140-6736(15)00473-0.
  24. da Cunha, B.R.; Fonseca, L.P.; Calado, C.R.C. Antibiotic discovery: Where have we come from, where do we go? *Antibiotics* **2019**, *8*, 1–21, doi:10.3390/antibiotics8020045.
  25. Zhang, C.; Straight, P.D. Antibiotic discovery through microbial interactions. *Curr. Opin. Microbiol.* **2019**, *51*, 64–71, doi:10.1016/j.mib.2019.06.006.
  26. Soule, T.; Garcia-Pichel, F. Cyanobacteria. *Encycl. Microbiol.* **2019**, 799–817, doi:10.1016/B978-0-12-809633-8.20886-8.
  27. Davies, J.; Davies, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2010**, *74*, 417–433, doi:10.1128/mubr.00016-10.
  28. Grenni, P.; Ancona, V.; Caracciolo, A.B. Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. *Microchem. J.* **2018**, *136*, 25–39, doi:10.1016/j.microc.2017.02.006.
  29. Sultan, I.; Rahman, S.; Jan, A.T.; Siddiqui, M.T.; Mondal, A.H.; Haq, Q.M.R. Antibiotics, resistome and resistance mechanisms: A bacterial perspective. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, doi:10.3389/fmicb.2018.02066.
  30. Netzker, T.; Flak, M.; Krespach, M.K.; Stroe, M.C.; Weber, J.; Schroeckh, V.; Brakhage, A.A. Microbial interactions trigger the production of antibiotics. *Curr. Opin. Microbiol.* **2018**, *45*, 117–123, doi:10.1016/j.mib.2018.04.002.
  31. Felis, E.; Kalka, J.; Sochacki, A.; Kowalska, K.; Bajkacz, S.; Harnisz, M.; Korzeniewska, E. Antimicrobial pharmaceuticals in the aquatic environment - occurrence and environmental implications. *Eur. J. Pharmacol.* **2020**, *866*, 172813, doi:10.1016/j.ejphar.2019.172813.
  32. Banin, E.; Hughes, D.; Kuipers, O.P. Editorial: Bacterial pathogens, antibiotics and antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* **2017**, *41*, 450–452, doi:10.1093/femsre/fux016.
  33. Karkman, A.; Do, T.T.; Walsh, F.; Virta, M.P.J. Antibiotic-Resistance Genes in Waste Water. *Trends Microbiol.* **2018**, *26*, 220–228, doi:10.1016/j.tim.2017.09.005.
  34. Le Page, G.; Gunnarsson, L.; Snape, J.; Tyler, C.R. Integrating human and environmental health in antibiotic risk assessment: a critical analysis of protection goals, species sensitivity and antimicrobial resistance. *Environ. Int.* **2017**, *109*, 155–169, doi:10.1016/j.envint.2017.09.013.
  35. Laxminarayan, R. Antibiotic effectiveness: Balancing conservation against innovation. *Science*. **2014**, *345*, 1299–1301, doi:10.1126/science.1254163.
  36. Centers for Disease Control and Prevention Antibiotic/Antimicrobial Resistance Available online: <https://www.cdc.gov/drugresistance/> (accessed on Sep 9, 2021).
  37. Laxminarayan, R.; Duse, A.; Wattal, C.; Zaidi, A.K.M.; Wertheim, H.F.L.; Sumpradit, N.; Vlieghe, E.; Hara, G.L.; Gould, I.M.; Goossens, H.; et al. Antibiotic resistance-the need for global solutions. *Lancet Infect. Dis.* **2013**, *13*, 1057–1098, doi:10.1016/S1473-3099(13)70318-9.
  38. Andersen, S.B.; Shapiro, J.; Vandembroucke-Grauls, C.; de Vos, M.G.J. Microbial evolutionary medicine: from theory to clinical practice. *Lancet Infect. Dis.* **2019**, *19*, 273–283,

- doi:10.1016/S1473-3099(19)30045-3.
39. Chatterjee, A.; Modarai, M.; Naylor, N.R.; Boyd, S.E.; Atun, R.; Barlow, J.; Holmes, A.H.; Johnson, A.; Robotham, J. V. Quantifying drivers of antibiotic resistance in humans: a systematic review. *Lancet Infect. Dis.* **2018**, *18*, 368–378, doi:10.1016/S1473-3099(18)30296-2.
  40. Pandey, V.D. Cyanobacterial natural products as antimicrobial agents. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* **2015**, *4*, 310–317.
  41. Schillaci, D.; Spanò, V.; Parrino, B.; Carbone, A.; Montalbano, A.; Barraja, P.; Diana, P.; Cirrincione, G.; Cascioferro, S. Pharmaceutical Approaches to Target Antibiotic Resistance Mechanisms. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 8268–8297, doi:10.1021/acs.jmedchem.7b00215.
  42. Direção-Geral da Saúde, Programa de Prevenção e Controlo De Infecções e De Resistência Aos Antimicrobianos; **2017**;
  43. Levy, S.B.; Bonnie, M. Antibacterial resistance worldwide: Causes, challenges and responses. *Nat. Med.* **2004**, *10*, 122–129, doi:10.1038/nm1145.
  44. Prarthana, J.; Maruthi, K.R. Fresh Water Algae as a Potential Source of Bioactive Compounds for Aquaculture and Significance of Solvent System in Extraction of Antimicrobials. *Asian J. Sci. Res.* **2019**, *12*, 18–28, doi:10.3923/ajsr.2019.18.28.
  45. Baquero, F.; Martínez, J.-L.; Cantón, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2008**, *19*, 260–265, doi:10.1016/j.copbio.2008.05.006.
  46. Frieri, M.; Kumar, K.; Boutin, A. Antibiotic resistance. *J. Infect. Public Health* **2017**, *10*, 369–378, doi:10.1016/j.jiph.2016.08.007.
  47. Furuya, E.Y.; Lowy, F.D. Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nat. Rev. Microbiol.* **2006**, *4*, 36–45, doi:10.1038/nrmicro1325.
  48. Fernandes, A.L. Antibióticos do Século XX - Ascensão e Declínio, Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade do Algarve, **2017**, <https://sapientia.ualg.pt/bitstream/10400.1/10467/1/Tese%20Andre%CC%81%20Lourenco%20-%20Final%202.pdf>.
  49. Berendonk, T.U.; Manaia, C.M.; Merlin, C.; Fatta-Kassinos, D.; Cytryn, E.; Walsh, F.; Bürgmann, H.; Sørum, H.; Norström, M.; Pons, M.N.; et al. Tackling antibiotic resistance: The environmental framework. *Nat. Rev. Microbiol.* **2015**, *13*, 310–317, doi:10.1038/nrmicro3439.
  50. Mishra, A.K.; Tiwari, D.N.; Rai, A.N. Cyanobacteria - From Basic Science to Applications; Fedor, J., Ed.; *Academic Press: India*, **2019**; ISBN 9780128146675.
  51. Tyers, M.; Wright, G.D. Drug combinations: a strategy to extend the life of antibiotics in the 21st century. *Nat. Rev. Microbiol.* **2019**, *17*, 141–155, doi:10.1038/s41579-018-0141-x.
  52. Khan, H.A.; Baig, F.K.; Mehboob, R. Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2017**, *7*, 478–482, doi:10.1016/j.apjtb.2017.01.019.
  53. World Health Organization, Prevenção de infeções adquiridas no hospital - Um guia prático; Duce, G., Fabry, J., L, N., Eds.; 2ª Edição.; Lisboa, **2002**.
  54. Tacconelli, E.; Carrara, E.; Savoldi, A.; Harbarth, S.; Mendelson, M.; Monnet, D.L.; Pulcini, C.; Kahlmeter, G.; Kluytmans, J.; Carmeli, Y.; et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.* **2018**, *18*, 318–327, doi:10.1016/S1473-3099(17)30753-3.
  55. World Health Organization, Antibacterial agents in clinical development: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis; **2017**.
  56. Menezes, C.; Caniça, M.; Dias, E. Actividade antibacteriana de extractos de *Planktothrix agardhii* contra *Staphylococcus aureus*. Poster apresentado no 5º Congresso Ibérico/1º Congresso Iberoamericano de Cianotoxinas, 17-19 de julho, Lugo, Espanha; **2017**,

- <https://repositorio.insa.pt/bitstream/10400.18/5644/1/5%20CIC%20Menezes%20et%20al.pdf>.
57. Udaondo, Z.; Matilla, M.A. Mining for novel antibiotics in the age of antimicrobial resistance. *Microb. Biotechnol.* **2020**, *13*, 1702–1704, doi:10.1111/1751-7915.13662.
  58. Swain, S.S.; Paidesetty, S.K.; Padhy, R.N. Antibacterial, antifungal and antimycobacterial compounds from cyanobacteria. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *90*, 760–776, doi:10.1016/j.biopha.2017.04.030.
  59. Gross, M. The race against antibiotics resistance. *Curr. Biol.* **2019**, *29*, 859–861, doi:10.1016/j.cub.2019.09.003.
  60. Jenkins, D.R. Nosocomial infections and infection control. *Medicine (Baltimore)*. **2017**, *45*, 629–633, doi:10.1016/j.mpmed.2017.07.005.
  61. Edwardson, S.; Cairns, C. Nosocomial infections in the ICU. *Anaesth. Intensive Care Med.* **2019**, *20*, 14–18, doi:10.1016/j.mpaic.2018.11.004.
  62. Ahamed, A.A.P.; Rasheed, M.U.; Noorani, K.P.M.; Reehana, N.; Santhoshkumar, S.; Imran, Y.M.M.; Alharbi, N.S.; Arunachalam, C.; Alharbi, S.A.; Akbarsha, M.A.; et al. In vitro antibacterial activity of MGDG-palmitoyl from *Oscillatoria acuminata* NTAPC05 against extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producers. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **2017**, *70*, 754–762, doi:10.1038/ja.2017.40.
  63. Subramani, R.; Narayanasamy, M.; Feussner, K.D. Plant-derived antimicrobials to fight against multi-drug-resistant human pathogens. *3 Biotech* **2017**, *7*, 1–15, doi:10.1007/s13205-017-0848-9.
  64. World Health Organization, Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics; **2017**; Vol. 43;.
  65. Theuretzbacher, U.; Bush, K.; Harbarth, S.; Paul, M.; Rex, J.H.; Tacconelli, E.; Thwaites, G.E. Critical analysis of antibacterial agents in clinical development. *Nat. Rev. Microbiol.* **2020**, *18*, 286–298, doi:10.1038/s41579-020-0340-0.
  66. World Health Organization WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed, Available online: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> (accessed on Sep 10, 2021).
  67. Pishchany, G. Applying microbial ecology to antimicrobial discovery. *Curr. Opin. Microbiol.* **2020**, *57*, 7–12, doi:10.1016/j.mib.2020.03.007.
  68. Peláez, F. The historical delivery of antibiotics from microbial natural products - Can history repeat? *Biochem. Pharmacol.* **2006**, *71*, 981–990, doi:10.1016/j.bcp.2005.10.010.
  69. Liu, T.; Yuan, K.; Zhang, Y. Active components, antimicrobial and antioxidant activities of extracts from *Melicope patulinervia*. *J. Med. Plants Res.* **2012**, *6*, 266–272, doi:10.5897/jmpr11.1234.
  70. Farghl, A.; El-Sheekh, M.; Mousa, A.S.H.H. Extraction and Characterization of Antimicrobial Active Substance From Cyanobacteria *Nostoc Carneum* and *Anabaena Circinalis*. *Fresenius Environ. Bull.* **2019**, *28*, 5481–5490.
  71. Kultschar, B.; Llewellyn, C. Secondary Metabolites in Cyanobacteria. In *Secondary Metabolites - Sources and Applications; Books on Demand: London*, **2018**.
  72. Carpine, R.; Sieber, S. Antibacterial and antiviral metabolites from cyanobacteria: Their application and their impact on human health. *Curr. Res. Biotechnol.* **2021**, *3*, 65–81, doi:10.1016/j.crbiot.2021.03.001.
  73. Elisha, I.L.; Botha, F.S.; McGaw, L.J.; Eloff, J.N. The antibacterial activity of extracts of nine plant species with good activity against *Escherichia coli* against five other bacteria and cytotoxicity of extracts. *BMC Complement. Altern. Med.* **2017**, *17*, 133, doi:10.1186/s12906-017-1645-z.
  74. Shannon, E.; Abu-Ghannam, N. Antibacterial derivatives of marine algae: An overview of

- pharmacological mechanisms and applications. *Mar. Drugs* **2016**, *14*, doi:10.3390/md14040081.
75. Singh, S.; Kate, B.N.; Banecjee, U.C. Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: An overview. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2005**, *25*, 73–95, doi:10.1080/07388550500248498.
  76. Singh, R.K.; Tiwari, S.P.; Rai, A.K.; Mohapatra, T.M. Cyanobacteria: An emerging source for drug discovery. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **2011**, *64*, 401–412, doi:10.1038/ja.2011.21.
  77. Nowruzzi, B.; Haghghat, S.; Fahimi, H.; Mohammadi, E. Nostoc cyanobacteria species: a new and rich source of novel bioactive compounds with pharmaceutical potential. *J. Pharm. Heal. Serv. Res.* **2018**, *9*, 5–12, doi:10.1111/jphs.12202.
  78. Jackson, N.; Czaplewski, L.; Piddock, L.J.V. Discovery and development of new antibacterial drugs: Learning from experience? *J. Antimicrob. Chemother.* **2018**, *73*, 1452–1459, doi:10.1093/jac/dky019.
  79. Moloney, M.G. Natural Products as a Source for Novel Antibiotics. *Trends Pharmacol. Sci.* **2016**, *37*, 689–701, doi:10.1016/j.tips.2016.05.001.
  80. Chlipala, G.E.; Mo, S.; Orjala, J. Chemodiversity in Freshwater and Terrestrial Cyanobacteria – A Source for Drug Discovery. *Curr. Drug Targets* **2011**, *12*, 1654–1673, doi:10.2174/138945011798109455.
  81. Zahra, Z.; Choo, D.H.; Lee, H.; Parveen, A. Cyanobacteria: Review of current potentials and applications. *Environments* **2020**, *7*, doi:10.3390/environments7020013.
  82. Khalifa, S.A.M.; Shedid, E.S.; Saied, E.M.; Jassbi, A.R.; Jamebozorgi, F.H.; Rateb, M.E.; Du, M.; Abdel-Daim, M.M.; Kai, G.Y.; Al-Hammady, M.A.M.; et al. Cyanobacteria—from the oceans to the potential biotechnological and biomedical applications. *Mar. Drugs* **2021**, *19*, doi:10.3390/md19050241.
  83. Huang, I.S.; Zimba, P. V. Cyanobacterial bioactive metabolites - A review of their chemistry and biology. *Harmful Algae* **2019**, *86*, 42–94, doi:10.1016/j.hal.2019.05.001.
  84. Dias, E.; Paulino, S.; Pereira, P. Cyanotoxins: From poisoning to healing-a possible pathway? *Limnetica* **2015**, *34*, 159–172.
  85. Huisman, J.; Codd, G.A.; Paerl, H.W.; Ibelings, B.W.; Verspagen, J.M.H.; Visser, P.M. Cyanobacterial blooms. *Nat. Rev. Microbiol.* **2018**, *16*, 471–483.
  86. Hamed, I. The Evolution and Versatility of Microalgal Biotechnology: A Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2016**, *15*, 1104–1123, doi:10.1111/1541-4337.12227.
  87. Wase, N. V.; Wright, P.C. Systems biology of cyanobacterial secondary metabolite production and its role in drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **2008**, *3*, 903–929, doi:10.1517/17460441.3.8.903.
  88. Lau, N.-S.; Matsui, M.; Abdullah, A.A.A. Cyanobacteria: Photoautotrophic Microbial Factories for the Sustainable Synthesis of Industrial Products. *Biomed Res. Int.* **2015**, doi:10.1155/2015/754934.
  89. Zanchett, G.; Oliveira-Filho, E.C. Cyanobacteria and cyanotoxins: From impacts on aquatic ecosystems and human health to anticarcinogenic effects. *Toxins (Basel)*. **2013**, *5*, 1896–1917, doi:10.3390/toxins5101896.
  90. Singh, S.K.; Kaur, R.; Bansal, A.; Kapur, S.; Sundaram, S. Biotechnological exploitation of cyanobacteria and microalgae for bioactive compounds. In *Biotechnological Production of Bioactive Compounds*; Elsevier B.V., **2020**; pp. 221–259.
  91. Sciuto, K.; Moro, I. Cyanobacteria: the bright and dark sides of a charming group. *Biodivers. Conserv.* **2015**, *24*, 711–738, doi:10.1007/s10531-015-0898-4.
  92. Abed, R.M.M.; Dobretsov, S.; Sudesh, K. Applications of cyanobacteria in biotechnology. *J. Appl. Microbiol.* **2009**, *106*, 1–12, doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03918.x.

93. Vijayakumar, S.; Menakha, M. Pharmaceutical applications of cyanobacteria - A review. *J. Acute Med.* **2015**, *5*, 15–23, doi:10.1016/j.jacme.2015.02.004.
94. Raja, R.; Hemaiswarya, S.; Ganesan, V.; Carvalho, I.S. Recent developments in therapeutic applications of Cyanobacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* **2016**, *42*, 394–405, doi:10.3109/1040841X.2014.957640.
95. Demay, J.; Bernard, C.; Reinhardt, A.; Marie, B. Natural products from cyanobacteria: Focus on beneficial activities. *Mar. Drugs.* **2019**, *17*, 1–49, doi:10.3390/md17060320.
96. Prasanna, R.; Sood, A.; Jaiswal, P.; Nayak, S.; Gupta, V.; Chaudhary, V.; Joshi, M.; Natarajan, C. Rediscovering cyanobacteria as valuable sources of bioactive compounds (Review). *Appl. Biochem. Microbiol.* **2010**, *46*, 119–134, doi:10.1134/S0003683810020018.
97. Mazur-Marzec, H.; Błaszczuk, A.; Felczykowska, A.; Hohlfeld, N.; Kobos, J.; Toruńska-Sitarz, A.; Devi, P.; Montalvão, S.; D'souza, L.; Tammela, P.; et al. Baltic cyanobacteria – a source of biologically active compounds. *Eur. J. Phycol.* **2015**, *50*, 343–360, doi:10.1080/09670262.2015.1062563.
98. Martins, R.; Pinto, C.; Dias, E.; Rosado, T.; Menezes, C. Intoxicação animal por cianobactérias: um alerta para a saúde pública?. Observações Boletim Epidemiológico do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge 29: 18-23. **2021**; [https://repositorio.insa.pt/bitstream/10400.18/7759/1/Boletim\\_Epidemiologico\\_Observacoes\\_N\\_29\\_2021\\_artigo4.pdf](https://repositorio.insa.pt/bitstream/10400.18/7759/1/Boletim_Epidemiologico_Observacoes_N_29_2021_artigo4.pdf).
99. Noaman, N.H.; Fattah, A.; Khaleafa, M.; Zaky, S.H. Factors affecting antimicrobial activity of *Synechococcus leopoliensis*. *Microbiol. Res.* **2004**, *159*, 395–402, doi:10.1016/j.micres.2004.09.001.
100. Seddek, N.H.; Fawzy, M.A.; Ragaey, M.M. Evaluation of antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities and characterization of bioactive substances from freshwater blue-green algae. *Glob. NEST J.* **2019**, *21*.
101. Abazari, M.; Zarrini, G.; Rasooli, I. Antimicrobial potentials of *Leptolyngbya* sp. and its synergistic effects with antibiotics. *Jundishapur J. Microbiol.* **2013**, *6*, 1–6, doi:10.5812/jjm.6536.
102. Adnan, M.; Alshammari, E.; Patel, M.; Ashraf, S.A.; Khan, S.; Hadi, S. Significance and potential of marine microbial natural bioactive compounds against biofilms/biofouling: Necessity for green chemistry. *PeerJ* **2018**, *6*, 1–18, doi:10.7717/peerj.5049.
103. Luo, S.; Kang, H.S.; Kronic, A.; Chlipala, G.E.; Cai, G.; Chen, W.L.; Franzblau, S.G.; Swanson, S.M.; Orjala, J. Carbamidocyclophanes F and G with anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity from the cultured freshwater cyanobacterium *Nostoc* sp. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 686–689, doi:10.1016/j.tetlet.2013.11.112.
104. Thuan, N.H.; An, T.T.; Shrestha, A.; Canh, N.X.; Sohng, J.K.; Dhakal, D. Recent advances in exploration and biotechnological production of bioactive compounds in three cyanobacterial genera: *Nostoc*, *Lyngbya*, and *Microcystis*. *Front. Chem.* **2019**, *7*, 1–33, doi:10.3389/fchem.2019.00604.
105. Xue, Y.; Zhao, P.; Quan, C.; Zhao, Z.; Gao, W.; Li, J.; Zu, X.; Fu, D.; Feng, S.; Bai, X.; et al. Cyanobacteria-derived peptide antibiotics discovered since 2000. *Peptides* **2018**, *107*, 17–24, doi:10.1016/j.peptides.2018.08.002.
106. Koumbis, A.E.; Dieti, K.M.; Vikentiou, M.G.; Gallos, J.K. D- and L-erythrose as sources of chiral quaternary carbon centers. Total synthesis of (-)-malyngolide and (+)-tanikolide. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 2513–2516, doi:10.1016/S0040-4039(03)00290-9.
107. Ghasemi, Y.; Yazdi, M.T.; Shafiee, A.; Amini, M.; Shokravi, S.; Zarrini, G. Parsiguine, a novel antimicrobial substance from *Fischerella ambigua*. *Pharm. Biol.* **2004**, *42*, 318–322, doi:10.1080/13880200490511918.

108. Falch, B.S.; König, G.M.; Wright, A.D.; Sticher, O.; Angerhofer, C.K.; Pezznto, J.M.; Bachrann, H. Biological Activities of Cyanobacteria: Evaluation of Extracts and Pure Compounds. *Planta Med.* **1995**, *61*, 321–328, doi:10.1055/s-2006-958092.
109. Ishida, K.; Matsuda, H.; Murakami, M.; Yamaguchi, K. Kawaguchipeptin B, an antibacterial cyclic undecapeptide from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 724–726, doi:10.1021/np970146k.
110. Mundt, S.; Kreitlow, S.; Jansen, R. Fatty acids with antibacterial activity from the cyanobacterium *Oscillatoria redekei* HUB 051. *J. Appl. Phycol.* **2003**, *15*, 263–267, doi:10.1023/A:1023889813697.
111. Ploutno, A.; Carmeli, S. Nostocyclone A, a novel antimicrobial cyclophane from the cyanobacterium *Nostoc* sp. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1524–1526, doi:10.1021/np0002334.
112. Berry, J.P.; Gantar, M.; Gawley, R.E.; Wang, M.; Rein, K.S. Pharmacology and toxicology of pahayokolide A, a bioactive metabolite from a freshwater species of *Lyngbya* isolated from the Florida Everglades. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* **2004**, *139*, 231–238, doi:10.1016/j.cca.2004.11.005.
113. Asthana, R.K.; Srivastava, A.; Kayastha, A.M.; Nath, G.; Singh, S.P. Antibacterial potential of  $\gamma$ -linolenic acid from *Fischerella* sp. colonizing Neem tree bark. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *22*, 443–448, doi:10.1007/s11274-005-9054-8.
114. Raveh, A.; Carmeli, S. Antimicrobial ambigunes from the cyanobacterium *Fischerella* sp. collected in Israel. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 196–201, doi:10.1021/np060495r.
115. Mo, S.; Kronic, A.; Chlipala, G.; Orjala, J. Antimicrobial ambigune isonitriles from the cyanobacterium *Fischerella ambigua*. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 894–899, doi:10.1021/np800751j.
116. Mo, S.; Kronic, A.; Pegan, S.D.; Franzblau, S.G.; Orjala, J. An antimicrobial guanidine-bearing sesterterpene from the cultured cyanobacterium *Scytonema* sp. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 2043–2045, doi:10.1021/np900288x.
117. Mo, S.; Kronic, A.; Santarsiero, B.D.; Franzblau, S.G.; Orjala, J. Hapalindole-related alkaloids from the cultured cyanobacterium *Fischerella ambigua*. *Phytochemistry* **2010**, *71*, 2116–2123, doi:10.1016/j.phytochem.2010.09.004.
118. Bui, H.T.N.; Jansen, R.; Pham, H.T.L.; Mundt, S. Carbamidocyclophanes A–E, Chlorinated Paracyclophanes with Cytotoxic and Antibiotic Activity from the Vietnamese Cyanobacterium *Nostoc* sp. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 499–503.
119. Preisitsch, M.; Harmrolfs, K.; Pham, H.T.L.; Heiden, S.E.; Füssel, A.; Wiesner, C.; Pretsch, A.; Swiatecka-Hagenbruch, M.; Niedermeyer, T.H.J.; Müller, R.; et al. Anti-MRSA-acting carbamidocyclophanes H–L from the Vietnamese cyanobacterium *Nostoc* sp. CAVN2. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **2015**, *68*, 165–177, doi:10.1038/ja.2014.118.
120. Tripathi, A.; Puddick, J.; Prinsep, M.R.; Rottmann, M.; Tan, L.T. Lagunamides A and B: Cytotoxic and antimalarial cyclodepsipeptides from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 1810–1814, doi:10.1021/np100442x.
121. Luesch, H.; Pangilinan, R.; Yoshida, W.Y.; Moore, R.E.; Paul, V.J. Pitipeptolides A and B, new cyclodepsipeptides from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 304–307, doi:10.1021/np000456u.
122. Banker, R.; Carmeli, S. Tenuocyclamides A–D, cyclic hexapeptides from the cyanobacterium *Nostoc spongiaeforme* var. tenue. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 1248–1251, doi:10.1021/np980138j.
123. Cabanillas, A.H.; Pérez, V.T.; Corral, S.M.; Valencia, D.F.R.F.; Quintana, A.M.; Doménech, M.O.; Sánchez, Á.R. Cybastacines A and B: Antibiotic Sesterterpenes from a *Nostoc* sp. Cyanobacterium. *J. Nat. Prod.* **2018**, *81*, 410–413, doi:10.1021/acs.jnatprod.7b00638.
124. Sarada, D.V.L.; Kumar, C.S.; Rengasamy, R. Purified C-phycocyanin from *Spirulina platensis*

- (Nordstedt) Geitler: A novel and potent agent against drug resistant bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, 27, 779–783, doi:10.1007/s11274-010-0516-2.
125. Abdel-Raouf, N.; Ibraheem, I.B.M. Antibiotic activity of two *Anabaena* species against four fish pathogenic *Aeromonas* species. *African J. Biotechnol.* **2008**, 7, 2644–2648, doi:10.5897/AJB08.356.
  126. KGaA, M. Ficha de dados de segurança de acordo com a Regulamento (CE) No. 1907/2006 Diclorometano. *VITA Zahnfabrik* 2019, 1–7.
  127. KGaA, M. Ficha de dados de segurança de acordo com a Regulamento (CE) No. 1907/2006 Metanol 2019, 1–22.
  128. KGaA, M. Ficha de dados de segurança de acordo com a Regulamento (CE) No. 1907/2006 Hexano. *VITA Zahnfabrik* 2016, 1–7.
  129. Roth, C. Ficha de Dados de Segurança n-Hexano 2020, 1–16.
  130. KGaA, M. Ficha de dados de segurança de acordo com a Regulamento (CE) No. 1907/2006 Dimetilsulfóxido. *VITA Zahnfabrik* 2019, 1–7.
  131. INSA Resistência aos Antimicrobianos Available online: <http://www2.insa.pt/sites/INSA/Portugues/AreasCientificas/DoencasInfecciosas/AreasTrabalho/ResistencAnti/Paginas/inicial.aspx> (accessed on Aug 16, 2021).
  132. INSA Vigilância Epidemiológica das Resistências aos Antimicrobianos Available online: <http://www2.insa.pt/sites/INSA/Portugues/Paginas/AntibioticosResi.aspx> (accessed on Feb 18, 2021).
  133. ATCC Bacteriology and Archaea Available online: <https://www.atcc.org/microbe-products/bacteriology-and-archaea#t=productTab&numberOfResults=12> (accessed on Aug 16, 2021).
  134. Public Health England National Collection of Type Cultures (NCTC) Available online: <https://www.phe-culturecollections.org.uk/collections/nctc.aspx> (accessed on Aug 16, 2021).
  135. Paulino, S.; Sam-Bento, F.; Churro, C.; Alverca, E.; Dias, E.; Valério, E.; Pereira, P. The estela sousa e silva algal culture collection: A resource of biological and toxicological interest. *Hydrobiologia* **2009**, 636, 489–492, doi:10.1007/s10750-009-9977-4.
  136. CIIMAR Blue Biotechnology and Ecotoxicology Culture Collection (LEGE-CC) Available online: <https://lege.ciimar.up.pt/> (accessed on Feb 18, 2021).
  137. University, G. Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen (SAG) Available online: <https://uni-goettingen.de/en/culture+collection+of+algae+%28sag%29/184982.html> (accessed on Feb 18, 2021).
  138. Skulberg, R.; Skulberg, O.M. Forskning Med Algekulturer NIVAs Kultursamling av Alger. Norway: NIVA. **1990**.
  139. Silva, B.L.T. Cyanobacteria from Cape Verde Islands: a contribution to the diversity and biotechnological potential. Dissertação de Mestrado em Biologia e Gestão da Qualidade da Água, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, **2019**, <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/125048/2/372375.pdf>.
  140. Macieira, R.V.S. Propriedades antibióticas de cianobactérias marinhas: em busca de novos antibióticos. Dissertação de Mestrado em Biologia e Gestão da Qualidade da Água, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, **2013**, [https://sigarra.up.pt/fcup/en/pub\\_geral.pub\\_view?pi\\_pub\\_base\\_id=24541](https://sigarra.up.pt/fcup/en/pub_geral.pub_view?pi_pub_base_id=24541).
  141. Castro, G.A. Antiparasitic potential of natural marine compounds. Dissertação de Mestrado em Biologia e Gestão da Qualidade da Água, Faculdade de Ciência da Universidade do Porto, **2016**, <https://repositorio-aberto.up.pt/handle/10216/102563>.
  142. European Committe on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method; **2021**; Vol. 0;

143. 20776-1, I. Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices — Part 1: Broth micro-dilution reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobi Available online: <https://www.iso.org/standard/70464.html> (accessed on Sep 10, 2021).
144. Alsenani, F.; Tupally, K.R.; Chua, E.T.; Eltanahy, E.; Alsufyani, H.; Parekh, H.S.; Schenk, P.M. Evaluation of microalgae and cyanobacteria as potential sources of antimicrobial compounds. *Saudi Pharm. J.* **2020**, *28*, 1834–1841, doi:10.1016/j.jsps.2020.11.010.
145. Dixit, R.B.; Suseela, M.R. Cyanobacteria: Potential candidates for drug discovery. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* **2013**, *103*, 947–961, doi:10.1007/s10482-013-9898-0.
146. Kini, S.; Divyashree, M.; Mani, M.K.; Mamatha, B.S. Algae and cyanobacteria as a source of novel bioactive compounds for biomedical applications; INC, **2020**; ISBN 9780128193112.
147. Wen, L.; Zhang, Z.; Sun, D.W.; Sivagnanam, S.P.; Tiwari, B.K. Combination of emerging technologies for the extraction of bioactive compounds. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2020**, *60*, 1826–1841, doi:10.1080/10408398.2019.1602823.
148. Bona, E.A.M. De; Pinto, F.G. da S.; Fruet, T.K.; Jorge, T.C.M.; Moura, A.C. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. *Arq. Inst. Biol. (Sao. Paulo).* **2014**, *81*, 218–225, doi:10.1590/1808-1657001192012.
149. Senhorinho, G.N.A.; Laamanen, C.A.; Scott, J.A. Bioprospecting freshwater microalgae for antibacterial activity from water bodies associated with abandoned mine sites. *Phycologia* **2018**, *57*, 432–439, doi:10.2216/17-114.1.
150. Ploutno, A.; Carmeli, S. Nostocyclone A, a novel antimicrobial cyclophane from the cyanobacterium *Nostoc* sp. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1524–1526, doi:10.1021/np0002334.
151. Wu, W.; Jin, Y.; Bai, F.; Jin, S. *Pseudomonas aeruginosa*; Elsevier Ltd, **2015**; Vol. 2; ISBN 9780123971692.
152. LewisOscar, F.; Nithya, C.; Alharbi, S.A.; Alharbi, N.S.; Thajuddin, N. Microfouling inhibition of human nosocomial pathogen *Pseudomonas aeruginosa* using marine cyanobacteria. *Microb. Pathog.* **2018**, *114*, 107–115, doi:10.1016/j.micpath.2017.11.048.
153. Ebrahimi, R.; Pournejati, R.; Karbalaeei-Heidari, H.R. *Pseudomonas aeruginosa* Growth Inhibitor, PAGI264: A Natural Product from a Newly Isolated Marine Bacterium, *Bacillus* sp. Strain REB264. *Iran. J. Sci. Technol. Trans. A Sci.* **2021**, *45*, 1165–1175, doi:10.1007/s40995-021-01107-2.
154. Padmini, N.; Ajilda, A.A.K.; Prabakaran, P.; Sivakumar, N.; Selvakumar, G. Efficacy of marine cyanobacterium *Oxynema thaianum* ALU PBC5 against multi drug resistant Gram negative pathogens; **2021**; Vol. 130; ISBN 9145652252.

## 8 Anexos

### Anexo I

#### Preparação de meio Z8

**Tabela I.1** – Composição das soluções usadas na preparação de meio de cultura Z8 [138].

Composição meio Z8	
Solução stock	Quantidade (mL/L)
Solução A	10
Solução B	10
Solução Fe-EDTA	10
Solução de micronutrientes	1
Solução stock A	
Composto	Quantidade (g/L)
NaNO <sub>3</sub>	46,7
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	5,9
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2,5
Solução stock B	
Composto	Quantidade (g/L)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,1
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2,1
Solução stock de Fe-EDTA	
Composto	Quantidade (mL/L)
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O (dissolução de 2,8 g do composto em 100 mL de HCl 0,1 M água bidestilada)	10
EDTA-Na <sub>2</sub> (dissolução de 3,9 g do composto em 100 mL de HCl 0,1 M água bidestilada)	9,5
Solução stock de micronutrientes	
Composto	Quantidade (g/100mL)
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,033
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> MoO <sub>7</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,088
KBr	0,12
KI	0,083
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,287
Cd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,155
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,146
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,125
NiSO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,198
Cr(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	0,041
V <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0,0089
Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> ·K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·24H <sub>2</sub> O	0,474

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,31
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	0,223

Nota: As quantidades dos compostos para cada solução stock foram adicionadas a 1 L de água ultrapura. Durante a preparação dos 5 L de meio Z8 usados para inocular as cianobactérias nos balões de 6 L, foram adicionados 50 mL de cada uma das soluções stock A, B e Fe-EDTA, e 5 mL da solução de micronutrientes a 5 L de água ultrapura.

Anexo II

Biomassa liofilizada das estirpes de cianobactérias

**Tabela II.1** – Quantidade de biomassa obtida após liofilização para cada estirpe.

Estirpe de cianobactéria	Código da estirpe	Quantidade de biomassa liofilizada (g)
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	LMECYA 088	1,8113
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	LMECYA 089	0,6551 (*)
<i>Aphanizomenon gracile</i>	LMECYA 009	1,7499
<i>Aphanizomenon gracile</i>	LMECYA 040	0,7153 (*)
<i>Arthrospira platensis</i>	SAG 85.79	3,4006
<i>Dolichospermum flos-aquae</i>	LMECYA 165	0,7105 (*)
<i>Dolichospermum flos-aquae</i>	LMECYA 180	1,4406
<i>Dolichospermum spiroides</i>	LMECYA 161	1,0835
<i>Leptolyngbya</i> sp.	LMECYA 079	3,554
<i>Leptolyngbya</i> sp.	LMECYA 173	0,6094 (*)
<i>Limnothrix redekei</i>	LMECYA 145	1,3363
<i>Microcystis aeruginosa</i>	LMECYA 050	0,9713
<i>Microcystis aeruginosa</i>	LMECYA 127	1,5378
<i>Nostoc</i> sp.	LMECYA 330	1,0347
<i>Nostoc commune</i>	LMECYA 290	0,7678
<i>Nostoc</i> sp.	LMECYA 291	0,5447 (*)
<i>Nostoc</i> sp.	LMECYA 333	0,3997 (*)
<i>Oscillatoria limosa</i>	SAG 42.87	3,31
<i>Planktothrix agardhii</i>	LMECYA 256	0,8521
<i>Planktothrix agardhii</i>	LMECYA 257	1,0178
<i>Planktothrix mougeotii</i>	LEGE 06224	0,7489 (*)
<i>Planktothrix rubescens</i>	LMECYA 203	0,733 (*)
<i>Raphidiopsis mediterranea</i>	LMECYA 287	0,5875 (*)
<i>Synechococcus nidulans</i>	LMECYA 156	0,4128 (*)
<i>Synechococcus nidulans</i>	LMECYA 236	0,809

Nota: Os valores destacados com (\*) correspondem às estirpes para as quais foram obtidas as menores quantidades de biomassa liofilizada.

### Anexo III

#### Protocolo de extração da biomassa com solventes (Adaptado de [139–141])

A extração da biomassa de cianobactérias foi realizada com o equipamento e material indicados na tabela III.1.

**Tabela III.1** - Material e equipamento utilizados para a extração da biomassa com solventes.

Material	Equipamento
Frascos de <i>Schott</i>	<i>Hotte</i>
Frascos de vidro com biomassa liofilizada	Placa de agitação magnética
Solventes: n-hexano, metanol, diclorometano, água ultrapura	Ultrassons
Tubos PP	Centrífuga
Tampas com septo de borracha	Balança analítica ( <i>Mettler</i> , H10w, Columbus, EUA)
Pipetador automático	Evaporador por gás inerte ( <i>TurboVap</i> ®LV)
Pipetas de vidro de 2 mL, 5 mL, 10 mL e 20 mL	Liofilizador
Seringa e agulhas	
Gelo	

As 25 estirpes foram extraídas em grupos de 5, de acordo com o procedimento a seguir detalhado.

#### Sequência de Extração:

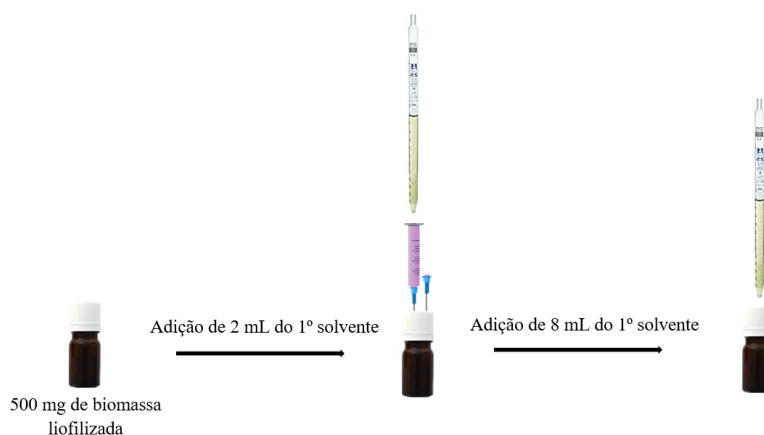
- (I) n-Hexano → Diclorometano:Metanol (2:1) → Metanol 70% → Água
- (II) Metanol 70% → Diclorometano:Metanol (2:1) → n-Hexano

#### Procedimento:

- Na *Hotte*, preparar 60 mL<sup>4</sup> das misturas de solventes metanol 70% e diclorometano:metanol (2:1):
  - Para o metanol 70% ⇒ Adicionar 42 mL de metanol e 18 mL de água ultrapura a um frasco de *Schott*;
  - Para a solução diclorometano:metanol (2:1) ⇒ Adicionar 40 mL de diclorometano e 20 mL metanol a um frasco de *Schott*.
- Colocar 500 mg de biomassa num frasco de vidro e adicionar 2 mL do 1ºsolvente da ordem de extração em cada um dos frascos de vidro, através de do sistema seringa-agulha<sup>5</sup> representado na figura seguinte:

<sup>4</sup> Para cada estirpe são necessários 10 mL de solvente.

<sup>5</sup> Para evitar a aspiração da biomassa pelo sistema de ventilação da *Hotte*, com a conseqüente perda de material liofilizado, o primeiro solvente é adicionado através de uma seringa (Figura III.1). Para tal, antes da adição do solvente, trocar as tampas



**Figura III.1** – Representação esquemática do sistema criado para a colocação do primeiro solvente.

- Após agitação magnética, acrescentar 8 mL do mesmo solvente, de modo a perfazer 10 mL de solvente adicionado.
- Repetir a agitação magnética durante 30 min, de forma a promover a extração de compostos, à temperatura ambiente.
- Colocar os extratos em gelo e sonicar (30%; 9,0 *on*; 2,0 *off*) durante 1 min.
- Repetir a agitação magnética, para extração adicional dos compostos da biomassa, durante 30 min, à temperatura ambiente.
- Transferir a solução obtida após extração para um tubo PP e centrifugar<sup>6</sup>.
- Recolher o sobrenadante e centrifugar novamente, nas mesmas condições.
- Recolher o sobrenadante, correspondente ao extrato final, e transferi-lo para um tubo PP, previamente pesado.
- Recolher o *pellet* de biomassa residual e repetir os passos anteriores com os solventes seguintes<sup>7</sup>, de acordo com a ordem de extração.
- Colocar os extratos obtidos para cada solvente num evaporador até à secagem total dos solventes hexano, diclorometano e metanol. Este processo ocorre a pressão controlada mas as condições<sup>8</sup> de temperatura para cada solvente variam, sendo de 35 °C para o diclorometano e 50 °C para o hexano e o metanol.
- Colocar os extratos que contenham a água como solvente no liofilizador, para desidratação completa dos mesmos.
- Pesar os tubos PP com cada extrato, e calcular a quantidade de extrato bruto obtido:

$$Peso_{Extrato\ bruto} = Peso_{Tubo\ PP+Extrato} - Peso_{Tubo\ PP}$$

- Armazenar os tubos PP com os extratos brutos a -20 °C até sua dissolução.

---

de plástico dos frascos de vidro por tampas com um septo de borracha para permitir a introdução da seringa. Após dissolução com o primeiro solvente, voltar a colocar as tampas de plástico.

<sup>6</sup> Condições de centrifugação para cada solvente: 5000xg, 5 min, 4 °C (hexano); 6000xg, 8 min, 4 °C (diclorometano:metanol, metanol 70% e água ultrapura).

<sup>7</sup> Após a extração da biomassa com o primeiro solvente, os 10 mL de cada um dos próximos solventes são adicionados de uma vez.

<sup>8</sup> Condições estabelecidas considerando o ponto de ebulição de cada solvente: hexano (69 °C), diclorometano (39 °C) e metanol (64 °C).

## Anexo IV

### Protocolo de Dissolução dos extratos com DMSO a 25% (Adaptado de [139–141])

**Tabela IV.1** – Material e equipamento usado para a dissolução dos extratos com DMSO.

Material	Equipamento
Micropipeta e pontas	Câmara de fluxo laminar
Tubos eppendorf de 2 mL	Densitômetro
DMSO (D-8418, Sigma-Aldrich)	Vórtex
Água ultrapura	Centrífuga
Tubos PP com os extratos	

#### Procedimento:

- Adicionar 500 µL de DMSO a cada tubo PP com o extrato.
- Agitar vigorosamente no vórtex cada tubo.
- Manter os tubos com os extratos e DMSO em repouso durante 1 h, à temperatura ambiente, para ocorrer a dissolução.
- Adicionar 500 µL de água ultrapura a cada tubo e repetir agitação no vórtex.
- Juntar 1000 µL de água ultrapura a cada tubo, de modo a obter uma solução com DMSO a 25%.
- Agitar novamente no vórtex e centrifugar tubos com a solução obtida a 8000xg, 5 min, 4 °C.
- Recolher os sobrenadantes obtidos para tubos eppendorf de 2 mL.
- Conservar cada extrato dissolvido a -20 °C.

Anexo V

**Tabela V.1** – Pesos dos tubos PP sem extrato (A), pesos dos tubos PP com extrato (B) e pesos dos extratos brutos (C), obtidos para cada estirpe após extração da biomassa com solventes, de acordo com a ordem de extração I (n-Hexano → Diclorometano:Metanol (2:1) → Metanol 70% → Água). (\*\*\*) Extratos não obtidos devido a dano acidental do material biológico.

Estirpe de cianobactéria	Código da estirpe	Hexano			Diclorometano:Metanol			Metanol 70%			Água		
		A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	LMECYA 088	6,7569	6,7797	0,0228	6,9541	6,9807	0,0266	6,9542	7,0254	0,0712	6,7294	6,9886	0,2592
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	LMECYA 089	6,7398	6,7585	0,0187	6,6979	6,7616	0,0637	6,8102	6,8544	0,0442	6,7075	6,7329	0,0254
<i>Aphanizomenon gracile</i>	LMECYA 009	6,9341	6,9561	0,022	6,9106	6,9695	0,0589	6,9384	6,9735	0,0351	6,7716	6,9316	0,16
<i>Aphanizomenon gracile</i>	LMECYA 040	6,6789	6,7016	0,0227	6,7428	6,805	0,0622	6,8282	6,8615	0,0333	6,7741	6,7943	0,0202
<i>Arthrospira platensis</i>	SAG 85.79	6,9379	6,9609	0,023	6,9297	6,9423	0,0126	7,0036	7,1232	0,1196	6,7716	6,9647	0,1931
<i>Dolichospermum flos-aquae</i>	LMECYA 165	6,9107	6,9373	0,0266	6,9074	7,0159	0,1085	6,9625	7,0017	0,0392	6,9385	6,9576	0,0191
<i>Dolichospermum flos-aquae</i>	LMECYA 180	6,9017	6,925	0,0233	6,8968	6,9628	0,066	6,8904	6,9202	0,0298	6,9319	6,9502	0,0183
<i>Dolichospermum spiroides</i>	LMECYA 161	6,8934	6,9161	0,0227	6,8702	6,9321	0,0619	6,9275	6,9845	0,057	6,9135	6,9397	0,0262
<i>Leptolyngbya</i>	LMECYA 079	6,9626	6,9873	0,0247	6,8598	6,9463	0,0865	7,0115	7,0434	0,0319	6,7361	6,9411	0,205
<i>Leptolyngbya</i>	LMECYA 173	6,7263	6,7426	0,0163	6,7118	6,7744	0,0626	6,7096	6,7431	0,0335	6,7544	6,7902	0,0358
<i>Limnothrix redekei</i>	LMECYA 145	6,8774	6,904	0,0266	7,0036	7,0948	0,0912	6,92	6,9534	0,0334	6,936	6,963	0,027
<i>Microcystis aeruginosa</i>	LMECYA 050	6,9466	6,9721	0,0255	6,9492	7,02	0,0708	6,9017	6,9361	0,0344	6,9306	6,9442	0,0136
<i>Microcystis aeruginosa</i>	LMECYA 127	6,9218	6,9475	0,0257	6,9151	6,9968	0,0817	6,8568	6,8851	0,0283	6,8518	6,8633	0,0115
<i>Nostoc</i> sp.	LMECYA 330	6,9511	6,9726	0,0215	6,9457	6,9741	0,0284	6,9132	6,9248	0,0116	6,9328	6,9357	0,0029
<i>Nostoc</i> sp.	LMECYA 290	6,93	6,9445	0,0145	6,9404	6,9897	0,0493	6,8971	6,9333	0,0362	6,9758	6,9971	0,0213
<i>Nostoc</i> sp.	LMECYA 291	6,8997	6,9217	0,022	6,9489	7,0119	0,063	6,932	6,9586	0,0266	6,9016	6,9208	0,0192
<i>Nostoc</i> sp.	LMECYA 333	6,9348	6,9555	0,0207	6,9315	6,9852	0,0537	6,956	6,9955	0,0395	6,9215	6,9352	0,0137
<i>Oscillatoria limosa</i>	SAG 42.87	6,9811	7,0047	0,0236	6,997	7,0486	0,0516	6,9383	6,9867	0,0484	6,7382	6,928	0,1898
<i>Planktothrix agardhii</i>	LMECYA 256	6,9643	6,986	0,0217	6,9903	7,058	0,0677	6,9209	**	**	6,9448	**	**
<i>Planktothrix agardhii</i>	LMECYA 257	6,9584	6,9828	0,0244	6,8922	6,9516	0,0594	6,8791	6,9052	0,0261	6,9415	6,9719	0,0304
<i>Planktothrix mougeotii</i>	LEGE 06224	6,8846	6,9079	0,0233	6,9065	6,9892	0,0827	6,9585	6,9908	0,0323	6,9079	6,933	0,0251
<i>Planktothrix rubescens</i>	LMECYA 203	6,8648	6,8881	0,0233	6,9554	7,0511	0,0957	6,9365	6,9774	0,0409	6,9204	6,9564	0,036
<i>Raphidiopsis mediterranea</i>	LMECYA 287	6,7244	6,7414	0,017	6,713	6,7848	0,0718	6,8207	6,8569	0,0362	6,7164	6,7415	0,0251
<i>Synechococcus</i>	LMECYA 156	6,6985	6,7154	0,0169	6,7588	6,8098	0,051	6,7124	6,7345	0,0221	6,7611	6,7735	0,0124

**Tabela V.2** – Pesos dos tubos PP sem extrato (A), com extrato (B) e dos extratos brutos (C), obtidos para cada estirpe após extração da biomassa com solventes, de acordo com a ordem de extração II (Metanol 70% → Diclorometano:Metanol (2:1) → n-Hexano). Os campos da tabela que não apresentam valores correspondem às estirpes que não foram extraídas segundo esta ordem de extração.

Estirpe de cianobactéria	Código da estirpe	Hexano			Diclorometano:Metanol			Metanol 70%		
		A	B	C	A	B	C	A	B	C
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	LMECYA 088	6,9047	6,9727	0,068	6,9784	7,0673	0,0889	6,9458	7,0112	0,0654
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	LMECYA 089					-				
<i>Aphanizomenon gracile</i>	LMECYA 009	6,9261	6,9405	0,0144	6,9643	7,0325	0,0682	6,9016	6,9306	0,029
<i>Aphanizomenon gracile</i>	LMECYA 040					-				
<i>Arthrospira platensis</i>	SAG 85.79	6,9392	6,893	-0,0462	7,0063	7,0664	0,0601	6,8869	6,9958	0,1089
<i>Dolichospermum flos-aquae</i>	LMECYA 165					-				
<i>Dolichospermum flos-aquae</i>	LMECYA 180	6,9542	6,9679	0,0137	6,8928	6,9662	0,0734	6,8742	6,9054	0,0312
<i>Dolichospermum spiroides</i>	LMECYA 161	6,8736	6,8881	0,0145	6,9117	7,074	0,1623	6,9475	6,9932	0,0457
<i>Leptolyngbya</i>	LMECYA 079	6,9726	6,9819	0,0093	6,8633	6,9185	0,0552	6,9161	6,956	0,0399
<i>Leptolyngbya</i>	LMECYA 173					-				
<i>Limnothrix redekei</i>	LMECYA 145	6,9009	6,9167	0,0158	6,9522	7,0056	0,0534	6,8447	6,879	0,0343
<i>Microcystis aeruginosa</i>	LMECYA 050	6,9167	6,9335	0,0168	6,9102	6,9743	0,0641	6,9164	6,945	0,0286
<i>Microcystis aeruginosa</i>	LMECYA 127	6,9335	6,9467	0,0132	6,8757	6,9233	0,0476	6,9047	6,9742	0,0702
<i>Nostoc sp.</i>	LMECYA 330	6,9007	6,9157	0,015	6,9441	6,9875	0,0434	6,9094	6,9301	0,0207
<i>Nostoc sp.</i>	LMECYA 290	6,876	6,8883	0,0123	6,9108	6,9329	0,0221	6,9114	6,9472	0,0358
<i>Nostoc sp.</i>	LMECYA 291					-				
<i>Nostoc sp.</i>	LMECYA 333					-				
<i>Oscillatoria limosa</i>	SAG 42.87	6,9088	6,9228	0,014	6,9296	6,9843	0,0547	6,9578	7,0019	0,0441
<i>Planktothrix agardhii</i>	LMECYA 256	6,9443	6,9603	0,016	6,8932	6,9328	0,0396	6,9332	6,9513	0,0181
<i>Planktothrix agardhii</i>	LMECYA 257	6,9483	6,9666	0,0183	6,885	6,9247	0,0397	6,935	6,9716	0,0366
<i>Planktothrix mougeotii</i>	LEGE 06224					-				
<i>Planktothrix rubescens</i>	LMECYA 203					-				
<i>Raphidiopsis mediterranea</i>	LMECYA 287					-				

<i>Synechococcus</i>	LMECYA 156					-					
<i>Synechococcus nidulans</i>	LMECYA 236	6,8646	6,8772	0,0126	6,9256	6,9657	0,0401	6,897	6,9108	0,0138	

## Anexo VI

Protocolo de Determinação da Concentração Inibitória Mínima de extratos de cianobactérias pelo método da Microdiluição (Adaptado dos procedimentos EUCAST [142])

Considerando que, de entre as bactérias avaliadas, apenas se verificou efeito de alguns extratos no crescimento da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, o procedimento que se segue foi delineado para esta estirpe bacteriana. O material e o equipamento necessários estão indicados na Tabela VI.1.

**Tabela VI.1** – Material biológico, reagentes e equipamentos usados para a determinação da CIM dos extratos pelo método da Microdiluição.

Material biológico, reagentes e equipamentos
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
E1 - LMECYA 088 Hexano (I)
E2 - SAG 42.87 MeOH 70% (II)
E3 - SAG 85.79 DCM:MeOH (2:1) (I)
E4 - SAG 85.79 MeOH 70% (I)
E5 - LMECYA 330 DCM:MeOH (2:1) (I)
E6 - LMECYA 330 DCM:MeOH (2:1) (II)
Imipenem (16-0,06 mg/L)
Meio MHB
Meio MHA
Solução salina 0,9%
Microplacas de 96 poços de fundo cónico
Micropipetas e pontas
Pipetas de Pasteur
Ansas
Câmara de fluxo laminar
Densitómetro
Vórtex

O esquema da microplaca usada para determinação da CIM dos extratos E1-E6 em *P. aeruginosa* está representado na Figura VI.1.

	Extratos 25%			Extratos 12,5%			Extratos 6,3%					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	E1	E1	E1	E1	E1	E1	E1	E1	E1	CS1	CS1	CS1
B	E2	E2	E2	E2	E2	E2	E2	E2	E2	CS2	CS2	CS2
C	E3	E3	E3	E3	E3	E3	E3	E3	E3	CS3	CS3	CS3
D	E4	E4	E4	E4	E4	E4	E4	E4	E4	CC	CC	CC
E	E5	E5	E5	E5	E5	E5	E5	E5	E5	CN	CN	CN
F	E6	E6	E6	E6	E6	E6	E6	E6	E6	16	8	4
G	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	2	1	0,5
H	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,25	0,125	0,06

**Figura VI.1** – Esquema da microplaca usada para determinação da CIM dos extratos E1-E6 em *P. aeruginosa* ATCC 27853. Os poços E1, E2, E3, E4, E5 e E6 contêm os extratos cianobacterianos, em três concentrações diferentes: 25% v/v ( $25 \mu\text{L}_{\text{Extrato}}/100\mu\text{L}_{\text{Volume final}}$ , colunas 1-3), 12,5% v/v ( $12,5 \mu\text{L}_{\text{Extrato}}/100\mu\text{L}_{\text{Volume final}}$ , colunas 4-6) e 6,25% v/v ( $6,25 \mu\text{L}_{\text{Extrato}}/100\mu\text{L}_{\text{Volume final}}$ , colunas 7-9). Os poços CS representam o controlo do solvente (CS1 - DMSO 25%; CS2 – 12,5%; CS3 – 6,25%). Os poços CC representam o controlo do crescimento de *P. aeruginosa* ATCC 27853. Os poços CN são o controlo negativo (meio MHB). As soluções diluídas de Imipenem foram adicionadas aos poços representados por números na fração azul da microplaca, que representam a concentração do antibiótico em mg/L.

### Procedimento:

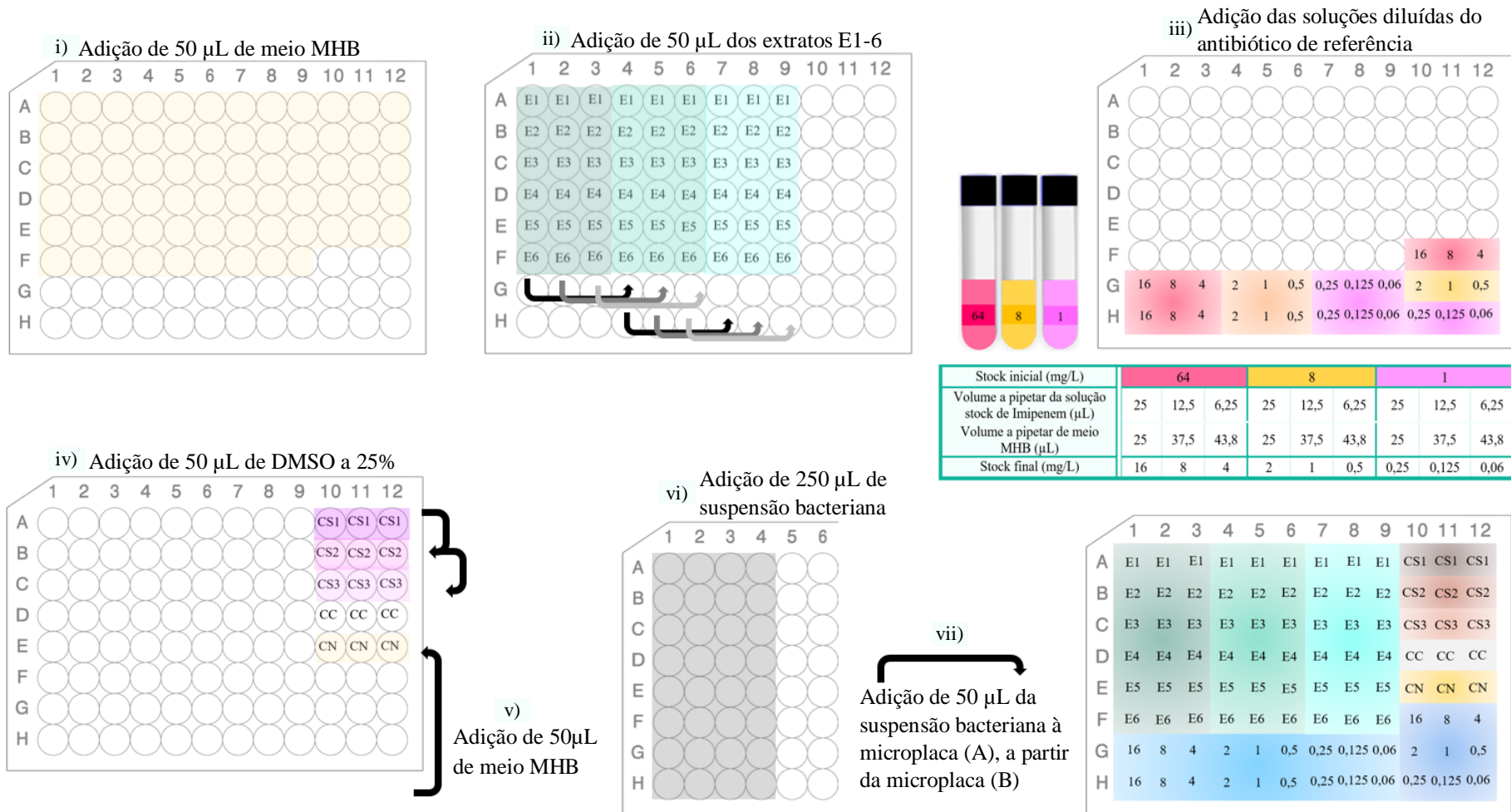
- Na câmara de fluxo laminar, preparar uma solução stock de imipenem 128 mg/L em tampão fosfato (pH = 7,23; 0,01 mol/L).
- Preparar soluções com diluições sucessivas de imipenem (controlo positivo) em meio MHB, nas concentrações 64 mg/L, 8 mg/L e 1 mg/L, a partir da solução stock.
- Nos poços 1-9 (A-F) e 10-11 (A-E) adicionar 50  $\mu\text{L}$  de meio MHB.
- Nos poços A1, 2 e 3 colocar 50  $\mu\text{L}$  do extrato E1. Proceder de forma igual para os poços 1, 2 e 3 das linhas B/E2, C/E3, D/E4, E/E5, F/E6.
- Transferir 50  $\mu\text{L}$  dos poços 1 (A-F) para os poços 4 (A-F), e destes para os poços 7 (A-F). Efetuar o mesmo para os poços 2→5→8 (A-F) e 3→6→9 (A-F). No fim deste passo, descartar 50  $\mu\text{L}$  dos poços 7-9 (A-F).
- Nos poços 1-9 (G-H) e 10-12 (F-H) adicionar meio MHB, de acordo com a Tabela VI.2. De seguida, adicionar aos mesmos poços (assinalados a azul na Figura VI.1) os volumes das soluções diluídas do imipenem descritos na tabela mencionada.
- Nos poços A10, 11 e 12 (CS1) colocar 50  $\mu\text{L}$  de DMSO a 25% (controlo do solvente). Transferir 50  $\mu\text{L}$  dos poços A10, 11 e 12 para os poços B10, 11 e 12 (CS2), e destes para os poços C10, 11 e 12 (CS3). No fim deste passo, descartar 50  $\mu\text{L}$  dos poços C10, 11 e 12.
- Nos poços E10, 11 e 12 adicionar 50  $\mu\text{L}$  de meio MHB (controlo negativo).
- Preparar a suspensão bacteriana de *P. aeruginosa*, numa densidade correspondente a 0,5 McFarland (correspondente a  $1 \times 10^8$  UFC/mL).

- Diluir a suspensão bacteriana 1:100 (80  $\mu$ L de suspensão bacteriana + 7920  $\mu$ L de meio MHB).
- Numa nova microplaca (B), nos poços 1-4 (A-H) adicionar 250  $\mu$ L da suspensão bacteriana.
- Transferir 50  $\mu$ L da suspensão bacteriana da microplaca (B) para todos os poços da microplaca (A) previamente preparada, exceto aos poços E10, 11 e 12 (controlo negativo), de acordo com a Figura VI.2.
- Incubar a 37 °C durante 18 h  $\pm$  2 h e analisar os resultados. A turvação do meio e a presença de precipitado branco indicam crescimento bacteriano.

**Tabela VI.2** – Descrição dos volumes das soluções diluídas do imipenem (64 mg/L, 8 mg/L e 1 mg/L) a pipetar para a microplaca.

Stock inicial (mg/L)	64			8			1		
Volume a pipetar da solução stock de Imipenem ( $\mu$ L)	25	12,5	6,25	25	12,5	6,25	25	12,5	6,25
Volume a pipetar de meio MHB ( $\mu$ L)	25	37,5	43,8	25	37,5	43,8	25	37,5	43,8
Stock final (mg/L)	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06

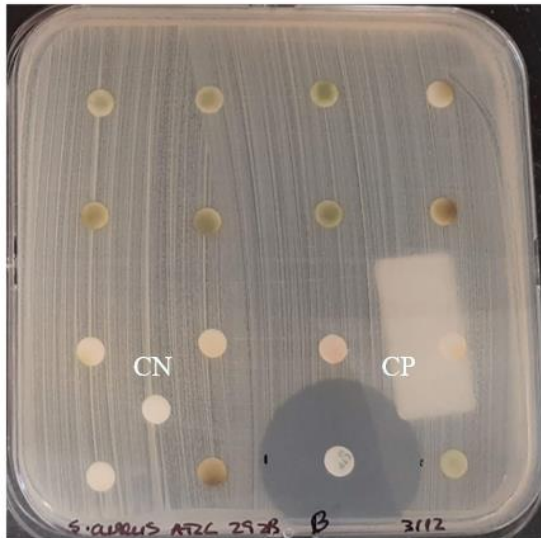
As principais etapas do protocolo de determinação da CIM dos extratos E1-6 estão representadas esquematicamente na Figura VI.2.



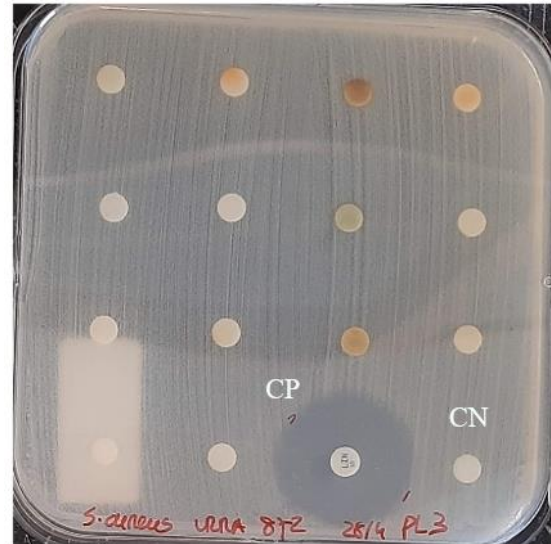
**Figura VI.2** – Esquema das principais etapas do procedimento de determinação da CIM dos extratos E1-E6 em *P. aeruginosa* ATCC 27853. (i) Adição de 50  $\mu$ L de meio MHB. (ii) Adição de 50  $\mu$ L dos extratos E1-E6. (iii) Adição das soluções diluídas do antibiótico de referência. (iv) Adição de 50  $\mu$ L de DMSO a 25 % aos poços CS. (v) Adição de 50  $\mu$ L de meio MHB aos poços CN. (vi) Adição de 250  $\mu$ L de suspensão bacteriana aos poços 1-4 (A-H) da microplaca (B). (vii) Adição de 50  $\mu$ L da suspensão bacteriana à microplaca (A), a partir da microplaca (B).

## Anexo VII

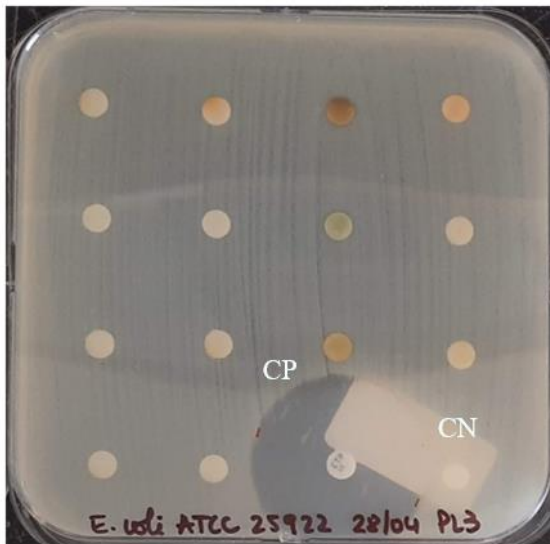
Exemplos de placas representativas da avaliação do efeito dos extratos das cianobactérias em cada uma das nove bactérias patogênicas, analisadas através do método da difusão em disco



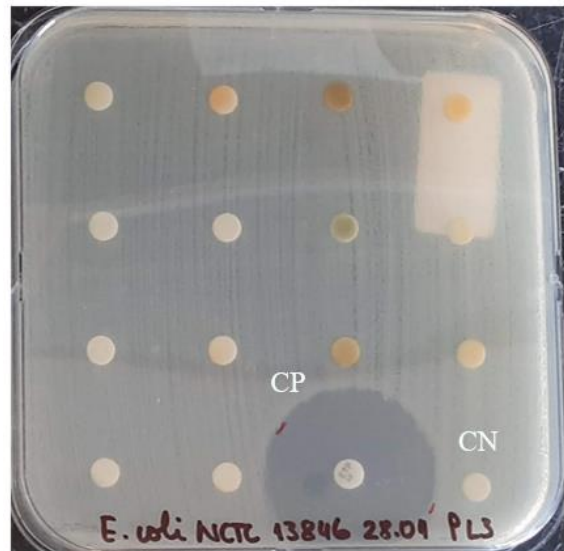
Avaliação de extratos (II) das cianobactérias *Aph. flos-aquae* (LMECYA 088), *Aph. gracile* (LMECYA 009), *Leptolyngbya* sp. (LMECYA 079), *A. platensis* (SAG 85.79) e *O. limosa* (SAG 42.87) em *S. aureus* ATCC 29213.



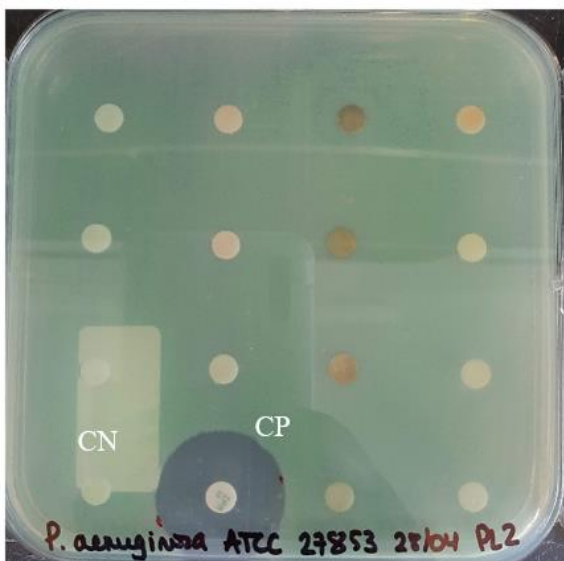
Avaliação de extratos (I) das cianobactérias *R. mediterranea* (LMECYA 287), *N. commune* (LMECYA 291), *P. mougeotii* (LEGE 06224) e LMECYA 333 em *S. aureus* URR 872.



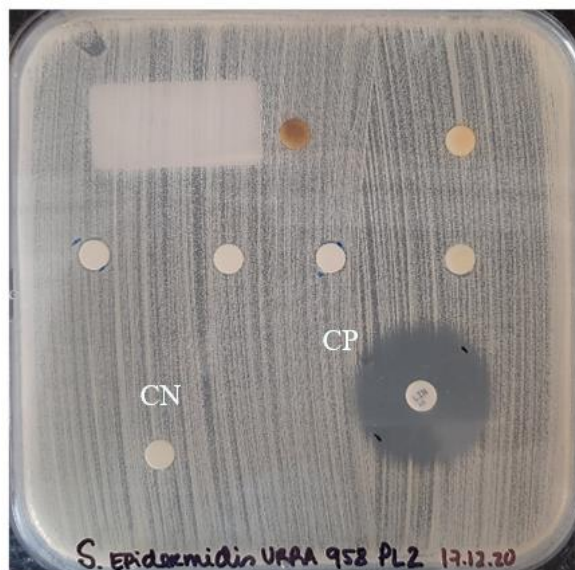
Avaliação de extratos (I) das cianobactérias *R. mediterranea* (LMECYA 287), *N. commune* (LMECYA 291), *P. mougeotii* (LEGE 06224) e LMECYA 333 em *E. coli* ATCC 25922.



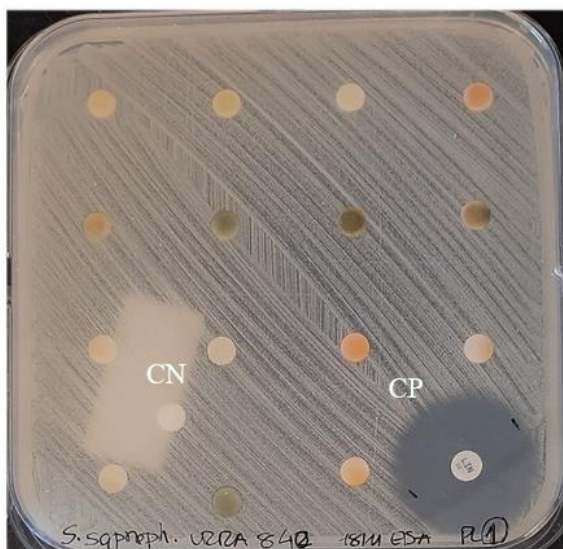
Avaliação de extratos (I) das cianobactérias *R. mediterranea* (LMECYA 287), *N. commune* (LMECYA 291), *P. mougeotii* (LEGE 06224) e LMECYA 333 em *E. coli* NCTC 13846.



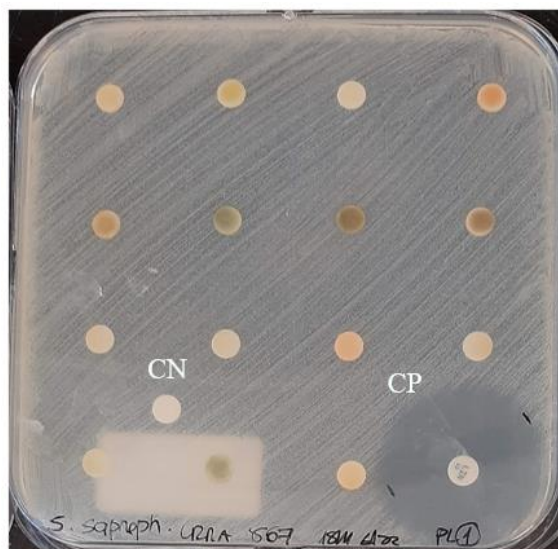
Avaliação de extratos (I) das cianobactérias *D. flos-aquae* (LMECYA 165), *Leptolyngbya* sp. (LMECYA 173), *P. rubescens* (LMECYA 203) e LMECYA 333 em *P. aeruginosa* ATCC 27853.



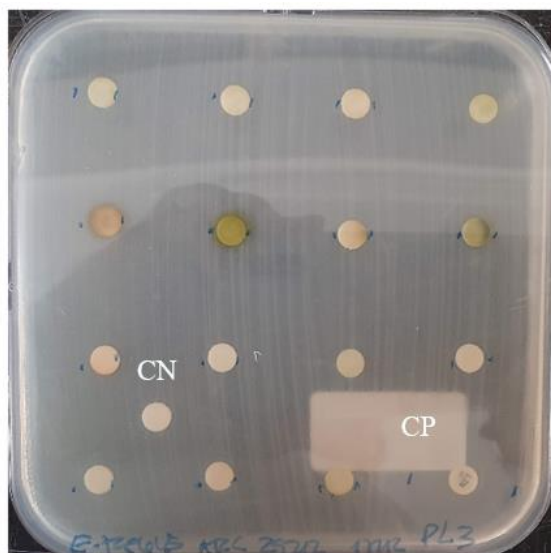
Avaliação de extratos (I) das cianobactérias *P. agardhii* (LMECYA 256) e *Nostoc* sp. (LMECYA 290) em *S. epidermidis* URAA 958.



Avaliação de extratos (I) das cianobactérias *Aph. flos-aquae* (LMEYCA 088), *Aph. gracile* (LMECYA 009), *Leptolyngbya* sp. (LMECYA 079), *A. platensis* (SAG 85.79) e *O. limosa* (SAG 42.87) em *S. saprophyticus* URAA 840.



Avaliação de extratos (I) das cianobactérias *Aph. flos-aquae* (LMEYCA 088), *Aph. gracile* (LMECYA 009), *Leptolyngbya* sp. (LMECYA 079), *A. platensis* (SAG 85.79) e *O. limosa* (SAG 42.87) em *S. saprophyticus* URAA 867.



Avaliação de extratos (II) das cianobactérias *D. spiroides* (LMECYA 161), *M. aeruginosa* (LMECYA 050), *P. agardhii* (LMECYA 256), *S. nidulans* (LMECYA 236) e *Nostoc* sp. (LMECYA 290) em *E. faecalis* ATCC 29212.