



Propriedades antibióticas de cianobactérias marinhas: em busca de novos antibióticos

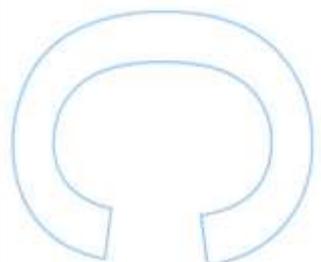
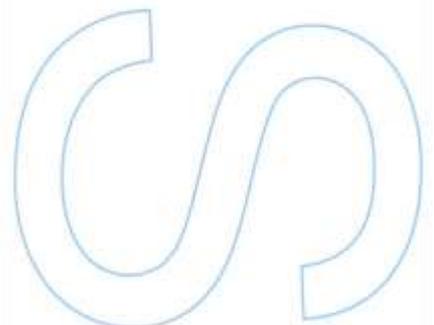
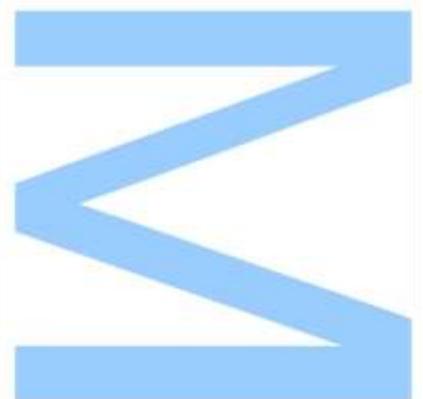
Rita Verónica Santos Macieira
Mestrado em Biologia e Gestão da Qualidade da Água
Departamento de Biologia
2013

Orientador

Vítor Vasconcelos, Professor Catedrático, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Coorientador

Paulo Martins da Costa, Professor Auxiliar, Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar

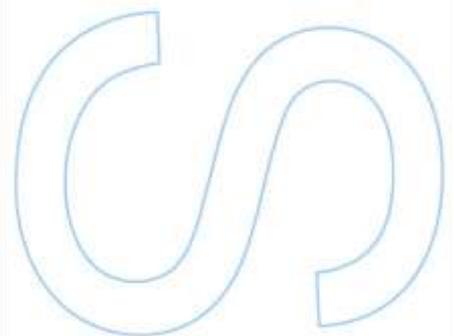
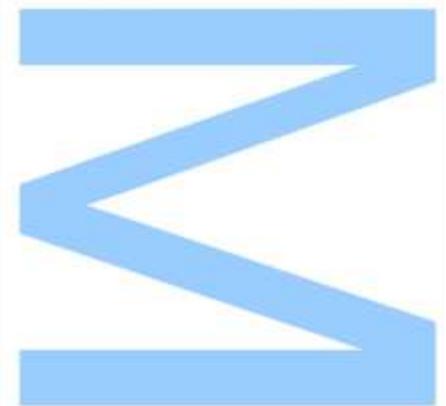




Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____ / ____ / ____



Este trabalho foi parcialmente financiado pelo Projeto INTERREG IV Pharmatlantic e pelo Projeto FCT PesT-C/MAR/LA0015/2011

Agradecimentos

Em primeiro lugar devo agradecer aos meus orientadores, o Professor Doutor Vítor Vasconcelos e ao Professor Doutor Paulo Martins da Costa, por me darem a oportunidade de trabalhar numa área na qual ainda não tinha tido oportunidade de explorar. Também devo agradecer todo o apoio que me deram quando decidi fazer mudanças “radicais” no meu trabalho, mas que me ajudaram a enriquecê-lo, e de certa forma me ajudaram a ter confiança naquilo que sou capaz de fazer.

A todas as pessoas que me ajudaram no LEGE, em especial ao Vítor Ramos que me cedeu várias vezes as cianobactérias que precisei e me ensinou a trabalhar com elas, tanto em cultura como na recolha. Ao Pedro Leão que me ensinou a fazer os extratos, uma das partes fundamentais do meu trabalho. Aos dois agradeço também a troca de ideias e opiniões que ajudaram a melhorar o conteúdo do meu trabalho.

A todas as outras pessoas do laboratório, a Joana Azevedo que me ajudava a usar o liofilizador, a Bárbara, a Ana Luísa, a Micaela, a Joana Martins que trocava comigo algumas ideias acerca do meu trabalho, a Marisa Silva e a Marisa Freitas e muitos outros que apesar de não terem contribuído para o trabalho acolheram-me bem no laboratório.

Agradeço também à Dona Elizabete que me ajudou bastante quando cheguei ao laboratório e continuou ao longo desta caminhada, à Lucinda que chegou na fase fundamental do meu trabalho e que também me ajudou bastante, quando as placas para carregar extrato pareciam não ter fim e ao Ângelo pelo incentivo e na ajuda que me prestou durante algumas fases do meu trabalho.

Agradeço às minhas amigas Mónica, Filipa e Marlene por me terem ajudado a aliviar algum stress que se ia acumulando e por me darem confiança de que as minhas decisões eram as mais acertadas que devia pensar sempre positivo, apesar de os resultados nem sempre serem os esperados. Não posso deixar de agradecer também à Fernanda e à Tânia que depois de saírem da Faculdade os nossos encontros não foram muitos, mas sempre muito proveitosos.

Um obrigada especial à Doutora Luísa por ter sempre permitido que eu não desistisse do que queria ser e ter sempre apoiado nos momentos mais difíceis. Às enfermeiras Helena e Carla por também me terem apoiado nesta caminhada. Também

a minha terapeuta Catarina e a todas as terapeutas da clínica por ter ouvido falar tantas vezes de cianobactérias e bactérias e das ideias que tinha para o meu trabalho, muito obrigada pela paciência e empenho em ajudar-me.

À minha família, as minhas madrinhas, os meus avós e primos que sempre me transmitiram confiança e sempre acreditaram em mim, a cientista da família.

Agradeço também a quem permitiu que eu estivesse agora finalizado esta etapa: os meus pais e a minha irmã, que sempre me encorajaram a seguir em frente mesmo quando as coisas não estavam fáceis e que fizeram e fazem tudo o está ao seu alcance para eu ser feliz. À recém- chegada Isabel que também veio animar os meus dias. Ao Eduardinho, a quem dedico todo este trabalho, por ser o menino que mais adoro, que me obriga a ver desenhos animados e brincar com ele nas alturas em que escrever a tese estava a chegar a um impasse e o melhor era afastar-me e refletir melhor as coisas. Obrigada por seres o menino que és: adorável e meigo.

Acho que também é importante agradecer a todos os que se cruzaram no meu caminho e que não estão aqui mencionados, mas que me ajudaram a ver o mundo de forma diferente e que de certa forma me tornaram no que sou hoje: uma pessoa que supera as dificuldades e não desiste, porque este é o meu destino...

Resumo

A resistência a antibióticos é, nos dias de hoje, um grave problema de saúde pública, uma vez que os antibióticos já existentes não conseguem combater infeções que até há poucos anos eram facilmente tratadas. Surge então a necessidade de encontrar novas substâncias que possam combater de forma eficaz estes microrganismos.

As cianobactérias, tanto de água doce como marinhas, são um dos recursos explorados pelas suas possíveis aplicações em biotecnologia, uma vez que para além das toxinas, produzem também metabolitos secundários bioativos, isto é, compostos capazes de influenciar o desenvolvimento de outros organismos. Estes compostos podem atuar de diversas formas e podem ter atividade antimicrobiana, antifúngica, antiviral, anti tumoral, anti-inflamatória entre muitas outras.

Foram selecionadas 32 estirpes de cianobactérias (18 marinhas e 14 de água doce), para avaliar o seu potencial antibiótico. Após o crescimento, realizou-se a extração orgânica dos metabolitos, sendo o extrato obtido, depois de seco, diluído a 100 mg/ mL.

Também foram selecionadas 8 estirpes bacterianas, sendo 4 Gram- positivo (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* e *Bacillus subtilis*) e quatro Gram- negativo (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella entérica* serovariedade Typhimurium). Para testar a bioatividade dos extratos foram testados os métodos de difusão em agar com aplicação do extrato em disco ou em poço, sendo que no primeiro método o inóculo foi espalhado na superfície (*Spread Plate*) e no segundo o inóculo foi incorporado no meio de cultura (*Pour Plate*). O método de difusão em poço (*Pour Plate*) foi otimizado para que o método fosse reproduzível.

No método de difusão a partir dos discos, estes foram carregados com 20 µg de extrato, não se tendo registado halos de inibição relativamente a qualquer dos extratos de cianobactérias marinhas. Quando se aumentou a concentração para 2 mg/ disco, verificou-se um derrame do extrato em virtude dos discos não suportarem a quantidade de extrato. Apesar desta limitação, observaram-se algumas zonas de inibição muito ténues. No método de difusão a partir do poço, estes foram carregados com 5 mg de extrato. Embora não se tenha definido um halo de inibição, com exceção de *Tolypothrix* sp. (LEGE 11397) que formou um halo de inibição com 8,45 mm de

diâmetro em *E. faecalis*, verificou-se uma diminuição no número de colónias à volta dos poços de *Nostoc edaphicum* (LEGE 07299) em *P. aeruginosa*, *B. subtilis* e *E. coli*, *Aphanizomenon flos-aquae* (LEGE 03277) em *E. coli*, *Aphanizomenon flos-aquae* (LEGE 03278) em *S. aureus*, *Planktothrix* sp. (LEGE 08334) em *E. faecalis* e *S. aureus*, *Romeria* sp. (LEGE 06013) em *K. pneumoniae*, *Anabaena* sp. (LEGE 03284) em *E. coli*, *Anabaena* sp. (LEGE 04288) em *S. aureus* e *B. subtilis*, *Phormidium autumnale* (LEGE 06222) em *S. aureus*, *Phormidium* sp. (LEGE 06072) em *S. aureus*, *Phormidium* sp. (LEGE 06078) em *S. aureus*, *Tolipothrix* sp. (LEGE 11397) em *E. faecalis*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*, *Cylindrospermopsis raciborskii* (LEGE 99043) em *S. aureus* e *Nodularia* sp. (LEGE 06071) em *S. aureus* e *B. subtilis* e os extratos de cianobactérias marinhas *Leptolyngbya* sp. (LEGE 06020) em *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *E. coli* e *S. aureus*, *Pseudanabaena* sp. (LEGE 06119) em *P. aeruginosa*, *Synechococcus nidulans* (LEGE 06156) em *P. aeruginosa*, *Cyanobium* sp. (LEGE 06184) em *E. faecalis* e *S. aureus*, *Leptolyngbya nodulosa* (LEGE 06120) em *K. pneumoniae*, *E. coli* e *S. aureus* e *Pseudanabaena* sp. (LEGE 06145) em *B. subtilis* e *E. coli*. O número de colónias foi quantificado num círculo com 1,5 cm de diâmetro que passava pelo centro do poço.

Os ensaios de sinergismo revelaram serem bastante promissores, conseguindo-se uma inibição ligeiramente maior quando o extrato era adicionado ao disco com antibiótico.

Palavras- chave: Cianobactérias, Bactérias resistentes, Alelopatia, Antibióticos, Sinergismo

Abstract

Antibiotic resistance is, nowadays, a very serious public health problem because the existing antibiotics are no longer effective against infections that a few years ago were easily cured. It is urgent to find new substances that can combat, in an effective way these microorganisms.

Cyanobacteria, marine and freshwater, are one of the most researched organisms for biotechnological uses because, besides the production of toxins, they also produce bioactive secondary metabolites that can influence the development of other organisms. These compounds can act as antimicrobial, antifungal, antiviral, anti-tumoral, anti-inflammatory among others.

For this work, it was selected 32 species of cyanobacteria (18 marines and 14 freshwater) to evaluate the antibiotic potential. After the growth, the organic extraction of the metabolites was carried out. The dried extract was concentrated at 100 mg/ mL.

It was also selected 8 bacterial species being 4 Gram- positive (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* and *Bacillus subtilis*) and 4 Gram- negative (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella Typhimurium*). To test the bioactivity of the crude extracts the disc diffusion assay and the well diffusion assay were used. In the first method the inoculum was spread on the surface of the agar (*Spread Plate*) and in the other the inoculum was incorporated in the agar medium (*Pour Plate*). The *Pour Plate* method was optimized, so that it could be reproducible.

In the disc diffusion assay, the discs were loaded with 20 µg of crude extract and the results were negative for the marine cyanobacteria species. Although the method didn't work as it was supposed, it was observed some inhibition zones, although the halo was not clear. In the well diffusion assay, each well was loaded with 5 mg of crude extract. Although it was not evident the presence of a clear halo, with exception of *Tolypothrix* sp. (LEGE 11397) that formed an inhibition halo of 8,45 mm around the well of *E. faecalis*, it was observed a decrease in the number of colonies around the well of the freshwater cyanobacteria *Nostoc edaphicum* (LEGE 07299) on *P. aeruginosa*, *B. subtilis* and *E. coli*, *Aphanizomenon flos- aquae* (LEGE 03277) on *E. coli*, *Aphanizomenon flos- aquae* (LEGE 03278) on *S. aureus*, *Planktothrix* sp. (LEGE 08334) on *E. faecalis* and *S. aureus*, *Romeria* sp. (LEGE 06013) on *K. pneumoniae*, *Anabaena* sp. (LEGE 03284) on *E. coli*, *Anabaena* sp. (LEGE 04288) on *S. aureus* and

B. subtilis, *Phormidium autumnale* (LEGE 06222) on *S. aureus*, *Phormidium* sp. (LEGE 06072) on *S. aureus*, *Phormidium* sp. (LEGE 06078) on *S. aureus*, *Tolipothrix* sp. (LEGE 11397) on *E. faecalis*, *S. aureus* and *P. aeruginosa*, *Cylindrospermopsis raciborskii* (LEGE 99043) on *S. aureus* and *Nodularia* sp. (LEGE 06071) on *S. aureus* and *B. subtilis* and the extracts of marine cyanobacteria *Leptolyngbya* sp. (LEGE 06020) on *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *E. coli* and *S. aureus*, *Pseudanabaena* sp. (LEGE 06119) on *P. aeruginosa*, *Synechococcus nidulans* (LEGE 06156) on *P. aeruginosa*, *Cyanobium* sp. (LEGE 06184) on *E. faecalis* and *S. aureus*, *Leptolyngbya nodulosa* (LEGE 06120) on *K. pneumoniae*, *E. coli* and *S. aureus* and *Pseudanabaena* sp. (LEGE 06145) on *B. subtilis* and *E. coli*, and the count of colonies was performed within a 1,5 cm diameter circle around the well.

The synergistic effect was very promising since the inhibition zone was greater when the extract was added to the antibiotic disc.

Keywords: Cyanobacteria, Resistant bacteria, Allelopathy, Antibiotics, Synergism

Índice

Introdução.....	14
1.1 Caraterísticas gerais.....	14
1.2 Metabolitos Secundários (Cianotoxinas).....	17
1.3 Outros metabolitos secundários com bioatividade (Alelopatia).....	20
1.4 Resistência a antibióticos.....	27
1.5 Objetivos.....	30
Material e Métodos.....	31
2.1 Produção de Biomassa.....	31
2.2 Extratos.....	36
2.2.1 Extratos.....	37
2.2.1.1 Extração orgânica.....	37
2.2.1.2 Extração aquosa.....	38
2.2.2 Fracionamento.....	40
2.2.3 Concentração dos extratos.....	42
2.3 Estirpes bacterianas.....	43
2.4 Avaliação do potencial antimicrobiano dos extratos.....	45
2.5 Potencial Sinérgico.....	49
Resultados.....	50
Discussão.....	60
Conclusões.....	64
Referências Bibliográficas.....	67
Anexos.....	72

Lista de figuras

Figura 2.1: Sistema montado para extração.....	37
Figura 2.2: Sistema montado para fracionamento do extrato	40
Figura 2.3: Avaliação do potencial antimicrobiano dos extratos para <i>S. aureus</i> ATCC 25 923 (no centro: controlo negativo).....	46
Figura 2.4: Potencial antimicrobiano dos extratos para <i>S. aureus</i> ATCC 25 923 (no centro: controlo positivo).....	46
Figura 2.5: Diluições seriadas.....	48
Figura 2.6: Teste de Sinergismo (Branco: disco de antibiótico; Verde: poço com 50 µL de extrato; Verde/ Branco: disco de antibiótico carregado com 20 µL de extrato).	50
Figura 3.1: Antibiograma de <i>E. coli</i> RA B4/ 105. O disco 9 (controlo negativo) mostra a interferência do Isooctano: Etanol.....	51
Figura 3.2: Antibiograma de <i>S. aureus</i> 29 213. O disco 9 (controlo negativo) mostra que não há interferência do DMSO.....	51
Figura 3.3: Antibiograma de <i>E. faecalis</i> 29 212. Os discos não estão completamente impregnados.....	53
Figura 3.4: halo de inibição produzido por <i>Tolypothrix</i> sp., LEGE 11397 em <i>E. faecalis</i>	57
Figura 3.5: Crescimento de bactéria Gram- positiva esporulada em meio MH após o espalhamento de 50 µL de extrato.....	57
Figura 3.6: A- Crescimento da bactéria à volta do poço em <i>P. aeruginosa</i> ; B- Sem crescimento da bactéria à volta do poço de <i>B. subtilis</i>	58
Figura 6.1: A- Stock de cianobactérias em matrizes de 100 mL e 1L; B- Crescimento em balão de 6 L e arejamento; C- Esterilização do material de vidro e descartável na câmara de fluxo com radiação Ultra-violeta	72
Figura 6.2: A- Recolha de cianobactérias usando rede de plâncton; B- Recolha de cianobactérias por centrifugação	72
6.3: A- Montagem do material para extração; B- Reagentes usados (Diclorometano e Metanol); C- Secagem do extrato em azoto gasoso.....	73
Figura 6.4: Antibiogramas para <i>B. subtilis</i>	78
Figura 6.5: Antibiogramas para <i>E. faecalis</i>	80
Figura 6.6: Antibiogramas para <i>E. coli</i>	84
Figura 6.7: Antibiogramas para <i>K. pneumoniae</i>	87
Figura 6.8: Antibiogramas para <i>L. monocytogenes</i>	91
Figura 6.9: Antibiogramas para <i>P. aeruginosa</i>	95
Figura 6.10: Antibiogramas para <i>S. thypimurium</i>	99
Figura 6.11: Antibiogramas para <i>S. aureus</i>	102

Figura 6.12: Sinergismo em <i>Enterococcus faecium</i> entre Vancomicina e extrato de <i>Tolypothrix</i> sp.	103
Figura 6.13: Sinergismo em <i>Enterococcus faecium</i> entre Vancomicina e extrato de <i>Leptolyngbya</i> sp.....	104
Figura 6.14: Sinergismo em <i>E. coli</i> entre Ciprofloxacina e extrato de <i>Leptolyngbya nodulosa</i>	105
Figura 6.15: Sinergismo em <i>E. coli</i> entre Ciprofloxacina e extrato de <i>Leptolyngbya</i> sp.	106
Figura 6.16: Sinergismo em <i>E. coli</i> entre Ciprofloxacina e extrato de <i>Pseudanabaena</i> sp.....	107
Figura 6.17: Sinergismo em <i>E. coli</i> entre Ciprofloxacina e extrato de <i>Anabaena</i> sp..	108
Figura 6.18: Sinergismo em <i>S. aureus</i> entre Oxacilina e extrato de <i>Anabaena</i> sp.	109
Figura 6.18: Sinergismo em <i>S. aureus</i> entre Oxacilina e extrato de <i>Pseudanabaena</i> cf. <i>frigida</i>	110
Figura 6.19: Sinergismo em <i>S. aureus</i> entre Oxacilina e extrato de <i>Leptolyngbya nodulosa</i>	111
Figura 6.20: Sinergismo em <i>S. aureus</i> entre Oxacilina e extrato de <i>Cyanobium</i> sp. .	112
Figura 6.21: Sinergismo em <i>S. aureus</i> entre Oxacilina e extrato de <i>Nodularia</i> sp.	113
Figura 6.22: Sinergismo em <i>S. aureus</i> entre Oxacilina e extrato de <i>Leptolyngbya</i> sp.	114

Lista de Quadros

Quadro 1.1: Divisão das Cianobactérias em Ordens (Waterbury, 2006)	14
Quadro 1.2: Grupos de toxinas produzidas por cianobactérias e estirpes produtoras (adaptado de Cood et al., 2005).....	18
Quadro 1.3: Compostos produzidos por cianobactérias com propriedades antimicrobianas/ antibióticas	21
Quadro 1.4: Extratos de diferentes cianobactérias com atividade antibiótica	23
Quadro 1.5: Mecanismos de resistência (adaptado de Manaia et al., 2011)	28
Quadro 2.1: Estirpes de cianobactérias marinhas	31
Quadro 2.2: Tempo de crescimento e peso seco	33
Quadro 2.3: Massa de extrato orgânico de cada estirpe	38
Quadro 2.4: Reagentes usados no fracionamento e frações recolhidas.....	41
Quadro 2.5: Massa de extrato fracionada e coluna de sílica usada	42
Quadro 2.6: Estirpes bacterianas selecionadas para a avaliação do potencial antimicrobiano dos extratos (primeira fase dos trabalhos)	44
Quadro 2.7: Estirpes de referência selecionadas para a avaliação do potencial antimicrobiano dos extratos (segunda fase dos trabalhos).....	45
Quadro 2.8: Discos de antibiótico usados como controlos positivos para cada estirpe bacteriana.....	46
Quadro 2.9: Volume de inóculo transferido para cada estirpe bacteriana para um volume de meio MH total de 80 mL.....	48
Quadro 3.1: Resultado Antibiogramas	51
Quadro 3.2: Resultado dos antibiogramas segundo o método da difusão em disco (2 mg/ disco para cianobactérias de água doce)	53
Quadro 3.3: Contagem do número de colónias com extratos de cianobactérias de água doce (Método de <i>Pour Plate</i>)	55
Quadro 3.4: Contagem do número de colónias com extratos de cianobactérias marinhas (Método de <i>Pour Plate</i>)	56
Quadro 3.5: Sinergismo entre extratos de cianobactérias (marinhas e de água doce) e antibióticos comerciais para <i>Enterococcus faecium</i> A5/ 102	59
Quadro 3.6: Sinergismo entre extratos de cianobactérias (marinhas e de água doce) e antibióticos comerciais para <i>E. coli</i> G9/ 101	59
Quadro 3.7: Sinergismo entre extratos de cianobactérias (marinhas e de água doce) e antibióticos comerciais para <i>S. aureus</i> 46/ 60	60

Introdução

1.1 Características gerais

As cianobactérias são um dos maiores subgrupos de procariontes Gram-negativo, são fotoautotróficas, uma vez que usam a energia solar como fonte energética, apesar de, em condições laboratoriais poderem ser heterotróficas e mixotróficas. É também considerado um dos grupos mais diversos tanto a nível morfológico como a nível do desenvolvimento (Rippka et al, 1979; Waterbury, 2006). Relativamente à classificação destes organismos, esta continua a ser ainda um pouco controversa, devido à incongruência de uma classificação baseada em características morfológicas com uma classificação baseada, em estudos genéticos e moleculares, que se verifica para alguns géneros cianobacterianos. Assim sendo, e como propõe Komárek (2011), é necessário usar um sistema único de classificação que deve ter uma abordagem polifásica e ter em consideração a análise molecular, características citomorfológicas, ecológicas e citofisiológicas, sendo que o uso de bases de dados computacionais é o melhor método para o registo taxonómico destes organismos (Komárek, 2005 e 2010).

No Quadro 1.1 pode-se conferir a divisão das cianobactérias em cinco ordens, de acordo com as suas características morfológicas e reprodutivas.

Quadro 1.1: Divisão das Cianobactérias em Ordens (Waterbury, 2006)

Ordem	Principais características	Géneros tipo
<i>Chroococcales</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Unicelulares; - Reprodução por fissão binária ou “budding” (divisão em um, dois ou três planos em ângulos retos ou em ângulos irregulares); - Tamanho celular: 0,5- 30 µm; - Podem ocorrer em formas unicelulares ou em agregados celulares. 	<ul style="list-style-type: none"> <i>Cyanobium</i> <i>Gloeocapsopsis</i> <i>Synechococcus</i> <i>Synechocystis</i>
<i>Pleurocapsales</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Reprodução por fissão 	<i>Cyanocystis</i>

	<p>múltipla;</p> <ul style="list-style-type: none"> - Formas unicelulares ou agregadas (fissão binária vegetativa); - Produção de baeocistos. 	<i>Dermocarpella</i>
<i>Oscillatoriales</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Filamentosas indiferenciadas; - Divisão celular por fissão binária (plano em ângulos retos em relação ao eixo mais longo do tricoma); - Reprodução por fragmentação do tricoma ou por produção de hormogonia indiferenciada libertada pela parte final dos tricomas; - Tamanho celular, forma e tricoma variam conforme a estirpe; - Diâmetro celular: 0,5- 100 µm; - Forma: <i>rod- shape</i> ou <i>disc- shape</i> 	<p><i>Leptolyngbya</i> <i>Phormidium</i> <i>Planktothrix</i> <i>Pseudanabaena</i> <i>Romeria</i></p>
<i>Nostocales</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Filamentosas capazes de diferenciação celular; - Divisão celular por fissão binária (plano em ângulos retos ao eixo mais longo do tricoma); - Diferentes tipos de células especializadas: <ul style="list-style-type: none"> a. heterocistos; b. acinetos; c. tricomas especializados na reprodução 	<p><i>Anabaena</i> <i>Aphanizomenon</i> <i>Calothrix</i> <i>Cylindrospermopsis</i> <i>Nodularia</i> <i>Nostoc</i> <i>Rivularia</i> <i>Scytonema</i> <i>Tolipothrix</i></p>

	(hormogonia); - Tricomas cónicos em resposta ao gradiente de azoto nos heterocistos terminais.	
<i>Stigonematales</i>	- Filamentosas capazes do mesmo grau de diferenciação que as <i>Nostocales</i> , mas capazes de divisão binária em planos múltiplos; - Talo com ramificação verdadeira; - Pode possuir tricomas unisseriados ou multisseriados.	<i>Nostochopsis</i> <i>Westiella</i>

Relativamente ao habitat, apesar da maioria das cianobactérias existirem em ambientes temperados, algumas também podem existir em ambientes extremos, isto é podem ser psicrófilas ($T_{max} = 20^{\circ} C$), mesófilas ($\Delta T = 4 - 40^{\circ} C$) ou termófilas ($T_{max} = 75^{\circ} C$); são mais frequentes em habitats com pH neutro a alcalino, não vivem em meios extremamente ácidos, mas podem existir em fontes termais com pH superior a 5; crescem a diferentes salinidades (halotolerantes), enquanto que outras têm pouca tolerância e são obrigadas a crescer num meio semelhante ao natural, isto se estiverem em cultura. Assim sendo, as cianobactérias toleram diferentes ambientes extremos, mas poucas parecem ser extremófilas. Outra característica importante é que pode viver em simbiose com outros organismos eucariotas (Waterbury, 2006).

Em condições laboratoriais, e para que se produza a quantidade de biomassa desejada, as cianobactérias devem crescer num ambiente semelhante àquele de onde foram recolhidas, isto é, o meio de cultura deve conter aproximadamente os mesmos nutrientes essenciais ao crescimento, a intensidade luminosa entre os $10 - 75 \mu E \cdot m^{-2} \cdot sec^{-1}$ com lâmpadas de aquecimento ou arrefecimento e fotoperíodo de 14 h/ 10 h e a temperatura deve ser semelhante à do local da colheita. É também importante salientar que as estirpes marinhas requerem no meio de cultura a presença de vitamina B12, sendo esta um fator de crescimento (Waterbury, 2006).

1.2 Metabolitos Secundários (Cianotoxinas)

Um dos aspetos que notabilizou as cianobactérias é a produção de florescências em meios aquáticos, que podem representar um risco para a saúde pública, visto que as cianobactérias podem ser produtoras de toxinas potentes (Carmichael et al., 2006; Codd et al., 2005; Karjalainen et al. 2008; Lips et al. 2008). Segundo Lips et al. (2008), existem fatores abióticos que influenciam o desenvolvimento de florescências, tóxicas ou não tóxicas. Assim sendo, estes fatores determinam qual a estirpe dominante e a duração da florescência, como por exemplo, a florescência formada por *Nodularia spumigena* é altamente dependente das condições climáticas, como a radiação fotossintética ativa e a temperatura da água, enquanto que para *Aphanizomenon* sp. o excesso de fósforo (P) de pré- florescências anteriores determina a intensidade da florescência.

Paerl et al. (2001) relaciona também o aparecimento de florescências com a atividade humana, sendo que a presença de nutrientes em excesso é uma consequência direta da atividade antrópica. Outros fatores apontados são também a presença de matéria orgânica, as concentrações de ferro e metais vestigiais, a condutividade e salinidade, a turbulência, o tempo de residência da água, a estratificação e estabilidade da coluna vertical da água, a introdução de espécies invasoras e também as alterações climáticas, que na realidade influenciam todos os fatores anteriormente descritos.

A produção de cianotoxinas não é exclusiva de uma única estirpe. Como se pode ver no Quadro 1.2, existem várias estirpes de cianobactérias capazes de produzirem cianotoxinas como microcistina, uma das cianotoxinas mais estudadas, visto que apresenta bastantes variações devido à substituição dos aminoácidos das posições 2 e 4 (Codd et al., 2005; Rinehart et al., 1994). Dependendo das vias de exposição às cianotoxinas, estas podem manifestar-se nos organismos de forma aguda ou de forma crónica. Quando a exposição é crónica, e no caso da microcistina e da nodularina isso é mais evidente, existe a possibilidade de haver a promoção de tumores, sendo que a exposição crónica pode ser devida à ingestão de água contaminada, como é o caso de zonas em que a água potável é extraída de albufeiras sujeitas a florescências de cianobactérias (Carmichael, 1992; Codd et al., 2005).

Estão reportados vários casos de contaminação em animais selvagens, sendo que, geralmente são mortes em massa e a fonte de contaminação é a água, animais domésticos e até mesmo em humanos, sendo que um dos casos mais famosos, devido à sua dimensão é o “Incidente de Caruaru”, em que 130 doentes renais

crônicos em regime de Hemodiálise foram intoxicados por microcistina, sendo que a contagem final de óbitos foi de 70 doentes, devido à exposição direta à microcistina (Jochimsen et al., 1998).

Quadro 1.2: Grupos de toxinas produzidas por cianobactérias e estirpes produtoras (adaptado de Cood et al., 2005)

Toxina	Estrutura e Atividade	Género
Microcistina (H)	Heptapéptido cíclico - Hepatotoxinas; - Inibição da proteína-fosfatase; - Disrupção da condutância e integridade das membranas; - Promoção de tumores.	<i>Microcystis</i> <i>Anabaena</i> <i>Nostoc</i> <i>Anabaenopsis</i> <i>Planktothrix</i> <i>Oscillatoria</i> <i>Hapalosiphon</i>
Nodularina (H)	Pentapéptido cíclico - Hepatotoxinas; - Inibição da proteína-fosfatase; - Disrupção da condutância e integridade das membranas; - Promoção de tumores; - Carcinogénico.	<i>Nodularia</i> <i>Theonella</i> (esponja em simbiose com cianobactérias)
Cilindrospermopsina (H)	Alcalóide de guanidina - Lesões necróticas no fígado, rins, baço, pulmões e intestino; - Inibição da síntese proteica; - Genotóxico.	<i>Cylindrospermopsis</i> <i>Aphanizomenon</i> <i>Umezakia</i> <i>Anabaena</i> <i>Raphidiopsis</i>
Anatoxina- a e homoanatoxina- a	Alcalóide - Pós- sinápticos;	<i>Anabaena</i> <i>Oscillatoria</i>

(N)	- Bloqueadores neuromusculares despolarizantes	<i>Phormidium</i> <i>Aphanizomenon</i> <i>Raphidiopsis</i>
Anatoxina- a (s) (N)	Guanidina de metil éster de fosfato - Inibição da acetilcolinesterase	<i>Anabaena</i>
Saxitoxina (N)	Alcalóide de carbamato - Bloqueador dos canais de sódio	<i>Aphanizomenon</i> <i>Anabaena</i> <i>Lyngbya</i> <i>Cylindrospermopsis</i> <i>Planktothrix</i>
Lingbiatoxina- a (DC)	Alcalóide - Agente inflamatório; - Ativadora da proteína quinase C	<i>Lyngbya</i> <i>Schizothrix</i> <i>Oscillatoria</i>
Aplitoxina (DC)	Alcalóide - Agente inflamatório; - Ativadora da proteína quinase C	<i>Lyngbya</i> <i>Schizothrix</i> <i>Oscillatoria</i>
Lipopolissacarídeos (E)	Lipopolissacarídeos - Agente inflamatório; - Irritante gastrointestinal	Possivelmente todos os Gêneros

(H): Hepatotoxinas; (N): Neurotoxina; (DC): Dermotoxinas e Citotoxinas; (E): Endotoxinas.

Neilan et al. (2012) salienta que existem fatores ambientais que influenciam a produção de toxinas, sendo que os fatores não são os mesmos para as diferentes estirpes de cianobactérias. De um modo geral, os nutrientes como azoto e fósforo são determinantes para haver uma maior produção de toxinas aquando da ocorrência de florescências, mas fatores como temperatura, intensidade luminosa, pH, salinidade e micronutrientes são também determinantes para a produção de toxinas.

1.3 Outros metabolitos secundários com bioatividade (Alelopatia)

Apesar da produção de cianotoxinas, estas também produzem citotoxinas, metabolitos secundários que não são altamente letais como as cianotoxinas, mas são capazes de apresentar bioatividade contra linhagens celulares, algas, bactérias e fungos (Carmichael, 1992).

As cianobactérias podem ser produtoras de compostos antibióticos, antivirais, anti-inflamatórios, anticancerígenos, anti-incrustantes (Abed et al., 2009; Burja et al., 2001; Dahms et al., 2006; Lopes et al., 2011). Para além disso, as cianobactérias podem ser usadas na produção de bioplásticos, com propósitos de biorremediação, como fonte alternativa de energia, biofertilizantes, biocidas, fonte saudável de alimentação e também como emulsificantes (Abed et al., 2009; Sharma et al., 2010).

A produção destes metabolitos secundários tem, por sua vez uma função ecológica definida, por exemplo Leão et al. (2012) comprovou que a exposição de comunidades microbianas a aleloquímicos de cianobactérias tinha um impacto na sua estrutura, em particular em cianobactérias e na taxa de eucarióticos unicelulares. Mundt et al. (2001) refere que a produção destes compostos pelas cianobactérias em meio natural pode ser a razão pela qual há a diminuição de bactérias, vírus e outros microrganismos presentes na água. Em teoria isto seria uma mais-valia, visto que poderia haver uma melhoria da qualidade da água, mas levanta-se a questão de estas também serem produtoras de toxinas, tornando a presença de cianobactérias um grave problema de saúde pública. A frequência de fenómenos de alelopatia pode diminuir se a densidade celular de cianobactérias for relativamente baixa, visto que esta também está relacionada com a fase de crescimento das cianobactérias, sendo que existe uma maior atividade alelopática no início da fase exponencial do crescimento das cianobactérias, ou seja, quando há um aumento da densidade celular (Leão et al., 2009 e 2010). Assim sendo, pode-se assumir que a produção destes metabolitos tem uma função ecológica definida, tal como as cianotoxinas, que passa pela dominância das cianobactérias no seu habitat.

A presença de cianobactérias em estações de tratamento de águas residuais pode apresentar riscos para o tratamento das águas devido às alterações que a produção de cianotoxinas e outros metabolitos com bioatividade, uma vez que têm efeitos negativos nos protozoários e nas bactérias, o que afeta o tratamento secundário (Martins et al., 2011).

Tal como foi referido anteriormente para as florescências tóxicas de cianobactérias, também a produção de metabolitos secundários com bioatividade depende de fatores abióticos e a disponibilidade de nutrientes tem sido várias vezes estudada, visto que é um fator determinante no tipo de metabolito que é produzido (Fish et al., 1994; Semary, 2011). Segundo Fish et al. (1994), o aumento da concentração basal de nitrato e a diminuição de NTA (ácido nitrilotriacético) e cloreto de ferro podem estimular a produção de compostos bioativos de uma estirpe de *Phormidium*, provando-se que as condições de crescimento determinam a quantidade e o tipo de compostos bioativos produzidos. Noutro trabalho, Fish et al. (1994) observou que uma estirpe de *Phormidium* termotolerante proveniente dos Açores produzia um composto com propriedades antibióticas, mas que a temperatura influenciava a quantidade de composto que era produzido. Também Semary (2011), usando uma estirpe de *Phormidium* provou que a diferentes concentrações de fosfato presentes no meio de cultura eram produzidos compostos diferentes e com bioatividades diferentes. Com estes estudos pode-se determinar quais as melhores condições para a produção destes compostos e, assim produzi-los em grandes quantidades.

Uma das maiores produtoras de compostos bioativos é *Lyngbya majuscula*. Esta estirpe tem um habitat tropical ou sub-tropical e é responsável pelas florescências marinhas causando o fenómeno “swimmers itch”. Apesar de ser produtora de toxinas potentes, também é produtora de outros metabolitos, sendo que 30 % dos compostos isolados pertencem a esta estirpe. Assim sendo, dos 113 compostos, 75 % apresentam bioatividade como, atividade antibiótica, anticancerígena, antifúngica, antiviral entre outras atividades (Burja et al. 2001).

Alguns dos compostos produzidos já foram isolados e no Quadro 1.3 podem-se consultar quais as cianobactérias que produzem compostos com atividade antimicrobiana e para quais bactérias os compostos exibem bioatividade.

Quadro 1.3: Compostos produzidos por cianobactérias com propriedades antimicrobianas/ antibióticas

Cianobactéria	Composto	Bioatividade	Referência
<i>Fischerella</i> sp.	Hapalindole T	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> ,	Asthana et al. 2006

		<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Escherichia coli</i>	
<i>Nodularia harveyana</i>	Norharmane	<i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Volk et al. 2006
<i>Nostoc commune</i>	Noscomin	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Escherichia coli</i>	Jaki et al. 2008
<i>Nostoc insulare</i>	4,4'-dihydroxybiphenyl	<i>Bacillus cereus</i>	Volk et al. 2006
<i>Phormidium</i> sp.	Eugenol 4-ter-butylcyclohexanol Ácido octadecanóico	<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	Semary et al. 2011
<i>Synechocystis</i> sp.	Oleic acid amide	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella typhae</i> , <i>Candida albicans</i>	Semary et al. 2009

Para descobrir o potencial antibiótico é necessário, inicialmente, fazer alguns testes com extratos brutos e fracionados. Por isso, no Quadro 1.4 estão registados os extratos de algumas cianobactérias que demonstraram ter alguma atividade contra algumas bactérias Gram- positivo e Gram- negativo.

Quadro 1.4: Extratos de diferentes cianobactérias com atividade antibiótica

Cianobactéria	Extrato (solvente)	Presença de bioactividade	Ausência de bioactividade	Referência
<i>Anabaena lemmermannii</i>	Metanol	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Micrococcus luteus</i> , <i>Escherichia coli</i>	Ostensvik et al. 1998
<i>Anabaena solitaria</i>	Hexano	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Micrococcus flavus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Kreitlow et al. 1999
<i>Anabaena</i> sp.	Hexano	<i>Micrococcus flavus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Kreitlow et al. 1999
<i>Anabaena variabilis</i>	Metanol	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Micrococcus flavus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Mundt et al. 2001
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	Água	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Micrococcus luteus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Escherichia coli</i>	Ostensvik et al. 1998
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	Metanol	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Escherichia coli</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	Ostensvik et al. 1998
<i>Calothrix gracilis</i>	n- Hexano	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Micrococcus flavus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Mundt et al. 2001
<i>Calothrix parietina</i>	Acetato de etilo	<i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus creus</i> , <i>Pseudomonas</i>		Issa, 1999

		<i>aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>		
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	Metanol	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> ,	<i>Micrococcus luteus</i> , <i>Escherichia coli</i>	Ostensvik et al. 1998
<i>Cylindrospermum majus</i>	n- Hexano	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Micrococcus flavus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Mundt et al. 2001
<i>Gloeocapsa caldariorum</i>	Metanol	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Micrococcus flavus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Mundt et al. 2001
<i>Limnothrix redekei</i>	n- Hexano e Metanol	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Micrococcus flavus</i>		Mundt et al. 2001
<i>Limnothrix</i> sp.	Hexano	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Micrococcus flavus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>		Kreitlow et al. 1999
	Acetato de etilo	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Micrococcus flavus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>Microcystis aeruginosa</i>	Água	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i>	<i>Micrococcus luteus</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Escherichia coli</i>	Ostensvik et al. 1998
<i>Microcystis aeruginosa</i>	Metanol	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Aeromonas</i>	<i>Micrococcus luteus</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	Ostensvik et al. 1998

		<i>hydrophila</i> , <i>Escherichia coli</i>		
<i>Nostoc muscorum</i>	Metanol	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Cannell et al. 1988
<i>Oscillatoria angustissima</i>	Acetato de etilo	<i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>		Issa, 1999
<i>Oscillatoria redekei</i>	Metanol	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Cannell et al. 1988
<i>Oscillatoria rubescens</i>	Metanol	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>		Kreitlow et al. 1999
<i>Oscillatoria tenuis</i>	Diclorometano	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Micrococcus flavus</i>	Kreitlow et al. 1999
<i>Oscillatoria</i> sp.	Metanol	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Cannell et al. 1988
<i>Oscillatoria</i> sp.	Diclorometano	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Micrococcus flavus</i>		Kreitlow et al. 1999
<i>Phormidium</i> sp.	Água	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus coagulans</i> ,	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas</i>	Fish et al. 1994

		<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus sphaericus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus faecalis</i> , <i>Streptococcus viridi</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Proteus morganii</i> , <i>Pseudomonas denitrificans</i>	<i>aeruginosa</i>	
<i>Pseudanabaena catenata</i>	Metanol	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Micrococcus flavus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Mundt et al. 2001
<i>Schizothrix</i> sp.	Metanol	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i>	Cannell et al. 1988
<i>Synechococcus leopoliensis</i>	Metanol	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Cannell et al. 1988
<i>Synechococcus</i> sp. (várias estirpes)	Diclorometano, Metanol, Hexano e Água	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>insidiosum</i> , <i>Cellulomonas uda</i>		Martins et al. 2008

<i>Synechocystis</i> sp. (várias estirpes)	Diclorometano, Metanol, Hexano e Água	<i>Clavibacter michiganensis</i> <i>subsp. insidiosum</i> , <i>Cellulomonas uda</i>		Martins et al. 2008
<i>Tychonema bourrellyi</i>	Água	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i>	<i>Micrococcus luteus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Escherichia coli</i>	Ostensvik et al. 1998
<i>Tychonema bourrellyi</i>	Metanol	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Escherichia coli</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	Ostensvik et al. 1998

Uma das bases de dados já existentes é a MarinLit, que contém dados da literatura sobre produtos naturais marinhos. Por sua vez o Drug Discovery Portal (DDP) agrega um conjunto de compostos muito diversos que ainda não estão disponíveis comercialmente. (Burja et al. 2001; Harvey, 2008). A existência destas bases de dados torna mais fácil a caracterização de novos compostos, uma vez que se pode fazer a comparação entre os compostos que são descobertos e os compostos que já foram isolados e identificados.

1.4 Resistência a antibióticos

A resistência a antibióticos é dos mais graves problemas de saúde pública atuais, visto que a resistência põe em causa o tratamento de diversas infeções bacterianas. O controlo deste problema requer a atenção de toda a sociedade, em especial dos prestadores de cuidados de saúde (Manaia et al., 2011).

O processo de resistência é algo inerente às bactérias, visto que já no habitat natural estas estão sujeitas a compostos muito semelhantes aos antibióticos que usamos, uma vez que os antibióticos são derivados dos seus análogos naturais. Neste

caso, a resistência deve-se a mutações genéticas, induzidas por agentes mutagénicos e a mutação ocorre ao acaso no genoma, e a recombinações genéticas, pela transferência horizontal de genes, sendo que esta não é limitada por barreiras geográficas e taxonómicas (Manaia et al., 2011).

O sucesso dos antibióticos prende-se com o facto de estes serem capazes de interferirem com funções ou estruturas da célula bacteriana e, por isso, o sucesso da resistência reside no facto das bactérias serem capazes de resistir a essa interferência (Manaia et al. 2011). No Quadro 1.5 faz-se a ligação entre os mecanismos de ação dos antibióticos e os mecanismos de resistência das bactérias.

Quadro 1.5: Mecanismos de resistência (adaptado de Manaia et al., 2011)

Mecanismo de ação		Classe de antibiótico	Mecanismos de resistência
Interferência com a síntese da parede celular		- Lactâmicos	- Hidrólise - Efluxo - Alteração do alvo
		- Glicopeptídeos	- Reprogramação da biossíntese de peptidoglicano
Inibição da síntese proteica- ligação à subunidade ribossomal	50S	Macrolídeos	- Hidrólise - Glicosilação - Fosforilação - Efluxo - Alteração do alvo
	30S	Tetraciclina	- Monoxigenação - Efluxo - Alteração do alvo
		Aminoglicosídeos	- Fosforilação - Acetilação - Nucleotidilação - Efluxo - Alteração do alvo
Inibição da síntese de ácidos nucleicos	DNA	Quinolonas	- Acetilação - Efluxo - Alteração do alvo

	RNA	Rifamicinas	- ADP ribossilação - Efluxo - Alteração do alvo
Inibição do caminho metabólico		Sulfonamidas	- Efluxo - Alteração do alvo
Disrupção da estrutura da membrana bacteriana		Polimixinas	- Alteração do alvo - Efluxo

É por isso, que cada vez mais é importante escolher o antibiótico certo para tratar as infeções, visto que o uso de antibióticos que possam não ter efeito pode, desta forma aumentar a resistência a antibióticos e aumentar a virulência da bactéria, já que existe uma ligação clara entre a patogenicidade e a resistência a antibióticos. Esta é uma das pressões seletivas para a resistência em ambientes naturais, posteriormente outros compostos e condições estarão relacionadas com pressões adicionais nas comunidades. Também o uso de antibióticos de largo espectro pode contribuir para a resistência, sendo que é preferível tratar infeções usando dois antibióticos de espectro reduzido, potenciando desta forma sinergismos e evitando que se criem resistências, visto que é mais difícil para a bactéria adquirir resistência para dois antibióticos que são tomados em simultâneo (Allen et al., 2010; Dancer, 2004).

O uso de antibióticos deve ser restrito, uma vez que muitas vezes infeções virais são tratadas com antibióticos, contribuindo para a disseminação destes para os meios recetores. Com o seu uso sendo restritivo, por exemplo para infeções por determinadas bactérias, o seu uso pode ser prolongado, visto que as bactérias não adquirem tão rapidamente resistência ao antibiótico específico (Dancer, 2004; Davies et al., 2010)

A água parece ser o principal vetor de transmissão de bactérias resistentes, visto que estirpes resistentes foram detetadas em zonas remotas e pouco ou nada sujeitas a pressões humanas, apesar destas poderem adquirir genes de resistência independentemente das atividades humanas (Allen et al., 2010; Mendes, 2012). As ETAR têm um papel importante na disseminação das resistências a antibióticos, uma vez que podem ser libertadas para o meio recetor cerca de 10^{12} UFC (unidades formadoras de colónias), sendo que 10^{10} UFC podem ter resistências adquiridas, e esta pode ser uma subestimação, visto que podem também existir bactérias que ainda não são cultiváveis, apesar de serem viáveis. A libertação para o meio ambiente destas bactérias pode representar um grave perigo, visto que estas podem contaminar

águas potáveis e, apesar destas serem desinfetadas antes de chegarem aos consumidores, as bactérias podem formar biofilmes nos reservatórios, canalizações e torneiras (Costa et al., 2006; Manaia et al., 2011). Estes biofilmes são verdadeiras estratégias de sobrevivência, uma vez que muito difíceis de erradicar.

Para além das águas residuais, também a alimentação dos animais (ração) e sistemas de aquacultura selecionam e disseminam para o meio recetor bactérias resistentes e antibióticos que não foram metabolizados. Na produção animal, uma das bactérias mais frequentes é *Enterococcus* sp. e também *E. coli*, sendo que muitas das vezes estas bactérias possuem resistências a antibióticos, como por exemplo tetraciclina e ampicilina, respetivamente (Costa et al., 2006; Teuber, 2001).

1.5 Objetivos

Como já foi referido anteriormente, os estudos do potencial farmacológico de organismos marinhos, nomeadamente de cianobactérias é uma realidade crescente. Estes estudos permitem que novos compostos possam ser isolados, identificados e produzidos em massa, criando novas hipóteses para tratamento de doenças que, anteriormente não eram facilmente tratadas. Assim sendo, um dos objetivos principais deste trabalho é encontrar substâncias antibióticas produzidas por cianobactérias isoladas de diferentes habitats de Portugal e comparar a produção deste tipo de substâncias em cianobactérias marinhas e cianobactérias de água doce. Para atingir os objetivos seguiram-se os seguintes passos:

1. Produção de biomassa em meio líquido
 - a. Produção em massa das estirpes de cianobactérias selecionadas
2. Extração de metabolitos secundários
 - a. Recurso a reagentes orgânicos para promover a lise celular e extrair compostos intracelulares
3. Antibiógramas
 - a. Método da difusão em agar a partir de um disco (espalhamento na superfície)
 - b. Método da difusão em agar a partir de um poço (incorporação no meio)
4. Sinergismo
 - a. Discos de antibióticos carregados com extratos com potencial antibiótico
 - b. Discos de antibióticos distanciados dos extratos carregados em poços

Material e Métodos

2.1 Produção de Biomassa

Na preparação deste trabalho foram selecionadas doze estirpes de cianobactérias marinhas pertencentes a duas ordens diferentes, sendo que oito estirpes pertenciam à ordem *Oscillatoriales* e quatro à ordem *Chroococcales*. O principal objetivo era obter alguma variedade de extratos a testar em bactérias Gram positivo e Gram negativo.

As estirpes usadas, e que podem ser consultadas no Quadro 2.1, foram repicadas do laboratório Laboratório de Ecotoxicologia, Genómica e Evolução (LEGE) para matrizes de 100 mL, previamente autoclavados e secos na estufa a 60° C, evitando qualquer tipo de contaminação. Foram preparados dois meios de cultura, uma vez que quatro estirpes crescem em meio MN B₁₂ e as outras oito em meio Z8 25‰ B₁₂. O meio Z8 25‰ B₁₂ foi preparado segundo Kotai et al. (1972), mas sendo suplementado com 25 mg/ mL de NaCl, uma vez que se tratam de estirpes marinhas. Antes de fazer a repicagem, todo o material de vidro e também o meio Z8 25‰, ainda sem a vitamina B₁₂ ficaram na estufa sujeitos a radiação UV durante 15 minutos. Por sua vez, o meio MN B₁₂ não ficou sujeito à radiação UV, em virtude dos compostos deste meio (previamente autoclavado) se poderem degradar. No final deste tempo o meio Z8 25‰ B₁₂ foi preparado, sendo adicionadas as soluções A, B, Fe-EDTA, micronutrientes e vitamina B₁₂.

Quadro 2.1: Estirpes de cianobactérias marinhas

Estirpe	Ordem	Código LEGE	Habitat	Meio
Fase 1				
<i>Phormidium corium</i>	<i>Oscillatoriales</i>	06007		Z8.25‰.B ₁₂
<i>Leptolyngbya</i> sp.	<i>Oscillatoriales</i>	06020		Z8.25‰.B ₁₂
<i>Pseudanabaena</i> cf. <i>frigida</i>	<i>Oscillatoriales</i>	06119		Z8.25‰.B ₁₂
<i>Leptolyngbya nodulosa</i>	<i>Oscillatoriales</i>	06120		Z8.25‰.B ₁₂
<i>Gloeocapsopsis</i> cf. <i>crepidinum</i>	<i>Chroococcales</i>	06123		MN B ₁₂
<i>Pseudanabaena</i> sp.	<i>Oscillatoriales</i>	06145		Z8.25‰.B ₁₂

Propriedades antibióticas de cianobactérias marinhas: em busca de novos antibióticos
FCUP 2013

<i>Synechocystis salina</i>	<i>Chroococcales</i>	06155		MN B ₁₂
<i>Synechococcus nidulans</i>	<i>Chroococcales</i>	06156		Z8.25‰.B ₁₂
<i>Cyanobium</i> sp.	<i>Chroococcales</i>	06184		Z8.25‰.B ₁₂
<i>Chroococcopsis</i> sp.	<i>Oscillatoriales</i>	07168		MN B ₁₂
<i>Leptolyngbya saxicola</i>	<i>Oscillatoriales</i>	07170		MN B ₁₂
<i>Pseudanabaena</i> sp.	<i>Oscillatoriales</i>	07185		Z8.25‰.B ₁₂
Fase 2				
<i>Anabaena</i> sp.	<i>Nostocales</i>	03284	Água doce	Z8
<i>Anabaena</i> sp.	<i>Nostocales</i>	04288	Água doce	Z8
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	<i>Nostocales</i>	03277	Água doce	Z8
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	<i>Nostocales</i>	03278	Água doce	Z8
<i>Calothrix</i> sp.	<i>Nostocales</i>	07166	Marinha	MN_B12
<i>Calothrix</i> sp.	<i>Nostocales</i>	06100	Marinha	MN_B12
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	<i>Nostocales</i>	99043	Água doce	Z8
<i>Nodularia</i> sp.	<i>Nostocales</i>	06071	Estuarina	Z8
<i>Nostoc edaphicum</i>	<i>Nostocales</i>	07299	Estuarina	Z8
<i>Nostoc</i> sp.	<i>Nostocales</i>	06077	Estuarina	Z8
<i>Phormidium autumnale</i>	<i>Oscillatoriales</i>	06222	Água doce	Z8
<i>Phormidium</i> sp.	<i>Oscillatoriales</i>	06072	Estuarina	Z8
<i>Phormidium</i> sp.	<i>Oscillatoriales</i>	06078	Estuarina	Z8
<i>Planktothrix</i> sp.	<i>Oscillatoriales</i>	08334	Água doce	Z8
<i>Rivularia</i> sp.	<i>Nostocales</i>	07178	Marinha	MN_B12
<i>Romeria</i> aff. <i>gracilis</i>	<i>Oscillatoriales</i>	07310	Estuarina	Z8
<i>Romeria</i> sp.	<i>Oscillatoriales</i>	06013	Marinha	Z8.25‰.B ₁₂
<i>Scytonema</i> sp.	<i>Nostocales</i>	07189	Marinha	MN_B12
<i>Scytonema</i> sp.	<i>Nostocales</i>	07182	Marinha	MN_B12
<i>Tolipothrix</i> sp.	<i>Nostocales</i>	11397	Água doce	Z8

Após a repicagem, o stock foi para a sala de culturas, onde foi mantido a uma temperatura de 25° C, luminosidade de 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sendo que havia um fotoperíodo de 14h /10h (dia/ noite). Passados 15 dias, as estirpes passaram para um

matraz de 1L com 500 mL de meio de cultura, com as mesmas condições que o stock. Novamente 15 dias mais tarde, as estirpes que crescem em Z8 25‰ B₁₂ passaram a crescer em balões de 6L com 4L de meio de cultura, para se obter uma maior quantidade de biomassa a usar nos ensaios. As condições de cultura são iguais às já mencionadas, mas foi adicionado o arejamento constante com o ar a ser filtrado por um filtro de 0,22µm para evitar contaminações. Apenas a estirpe *Leptolyngbya nodulosa* (LEGE 06120) não teve um arejamento constante, visto que se registou uma maior produção de biomassa quando o crescimento era estático. As estirpes de MN B12 não passaram para cultura em balão, uma vez o seu crescimento era muito lento e necessitavam de uma maior área e não de um maior volume para crescerem. Desta forma foram mantidas em matrizes de 1L com 500 mL de meio e matrizes de 2L com 1L de meio de cultura. A única estirpe que passou para balão foi *Synechocystis salina* (LEGE 06155), mas sem arejamento e apenas um mês após ter iniciado e seu crescimento em matraz de 1L.

Aproximadamente um mês após o início do crescimento, as cianobactérias que crescem em Z8 25‰ B₁₂ foram recolhidas quer por centrifugação, quer por rede de plâncton, dependendo do tamanho das células. As estirpes de MN B₁₂ foram sendo repicadas para vários matrizes e apenas quando se tinha biomassa suficiente eram recolhidas, podendo demorar dois a três meses para se realizar a recolha. Quando se optava por recolher por centrifugação, esta era realizada a 4600 rpm durante 15- 30 minutos, sendo que a biomassa era lavada com água destilada para eliminar a salinidade que estava presente no meio, e para que esta não interferisse com os ensaios que se seguiriam. Depois de recolhida a biomassa era armazenada a -20° C e, posteriormente liofilizada cerca de cinco dias, dependendo da quantidade de água que existia no falcon ou frasco. Após ter sido liofilizada, a biomassa foi pesada (Quadro 2.2) e armazenada novamente a -20° C até ser usada.

Quadro 2.2: Tempo de crescimento e peso seco

<i>Estirpe e Código</i>	<i>Início do crescimento</i>	<i>Fim do crescimento</i>	<i>Peso seco (g)</i>
Fase 1			
<i>Phormidium corium</i> LEGE 06007	20-10-2011	13-12-2011	0,1231
	26-01-2012	29-02-2012	0,2802
	20-03-2012	24-04-2012	0,3038
	04-05-2013	22-06-2013	1,0214

Propriedades antibióticas de cianobactérias marinhas: em busca de novos antibióticos
FCUP 2013

	04-07-2013	06-08-2013	0,7100
<i>Leptolyngbya</i> sp. LEGE 06020	20-10-2011	05-12-2011	1,1493
	07-02-2012	07-03-2012	0,5172
	27-03-2012	30-04-2012	1,1777
	23-05-2012	03-07-2012	0,8672
	23-04-2013	28-05-2013	0,8953
<i>Pseudanabaena</i> cf. <i>frigida</i> LEGE 06119	20-10-2011	29-11-2011	0,6759
	21-12-2011	23-01-2012	0,4525
	14-02-2012	15-03-2012	1,1598
	03-04-2012	07-05-2012	0,4650
	23-05-2012	09-07-2012	0,6182
	04-05-2013	11-06-2013	1,6616
<i>Leptolyngbya</i> <i>nodulosa</i> LEGE 06120	20-10-2011	15-12-2012	0,3971
	07-02-2012	08-03-2012	0,5259
	20-03-2012	24-04-2012	0,1015
	09-05-2012	12-06-2012	0,3217
	23-05-2012	02-07-2012	0,5220
	04-05-2013	22-06-2013	1,5822
	04-07-2013	06-08-2013	0,8258
<i>Pseudanabaena</i> sp. LEGE 06145	20-10-2011	14-12-2011	0,2203
	26-01-2012	27-02-2012	0,1968
	20-03-2012	24-04-2012	1,3776
	03-04-2012	17-05-2012	0,3885
	04-05-2013	22-06-2013	0,4494
<i>Synechococcus</i> <i>nidulans</i> LEGE 06156	20-10-2011	28-11-2011	0,7406
	10-11-2011	03-01-2012	0,9296
	07-05-2012	12-06-2012	1,0609
	23-04-2013	31-05-2013	0,8908
<i>Cyanobium</i> sp. LEGE 06184	20-10-2011	30-11-2011	0,6613
	21-12-2011	24-01-2012	0,3993
	14-02-2012	14-03-2012	0,3820
	04-05-2013	08-07-2013 ¹	2,7578
	04-06-2013	08-07-2013	

¹ A cianobactéria foi deixada a crescer durante mais tempo, visto que inicialmente não tinha arejamento. Quando foi adicionado arejamento a cianobactérias cresceu normalmente.

<i>Pseudanabaena</i> sp. LEGE 07185	20-10-2011	12-12-2011	0,2433
	26-01-2012	06-03-2012	0,3109
	20-03-2012	23-04-2012	0,2805
Fase 2			
<i>Anabaena</i> sp. LEGE 03284	04-09-2012	08-10-2012	0,4184
	06-02-2013	12-03-2013	1,4598
<i>Anabaenacx</i> sp LEGE 04288.	04-09-2012	15-10-2012	0,7484
	05-11-2012	29-11-2012	1,6397
	24-01-2013	05-03-2013	0,7207
<i>Aphanizomenon</i> <i>flos-aquae</i> LEGE 03277	04-09-2012	15-10-2012	0,6484
	05-11-2012	19-12-2012	0,5996
<i>Aphanizomenon</i> <i>flos-aquae</i> LEGE 03278	05-09-2012	16-10-2012	0,8052
	24-01-2013	11-03-2013	0,8800
<i>Cylindrospermopsis</i> <i>raciborskii</i> LEGE 99043	05-09-2012	16-10-2012	0,6456
	22-01-2013	25-02-2013	1,3276
<i>Nodularia</i> sp LEGE 06071	05-09-2012	20-10-2012	0,7395
	22-01-2013	27-03-2013	0,9111
<i>Nostoc edaphicum</i> LEGE 07299	06-09-2012	13-10-2012	0,6894
<i>Nostoc</i> sp. LEGE 06077	06-09-2012	08-10-2012	0,5453
	22-10-2012	18-12-2012	1,1427
	22-01-2013	25-02-2013	1,4275
<i>Phormidium</i> <i>autumnale</i> LEGE 06222	06-09-2012	20-10-2012	1,0417
<i>Phormidium</i> sp. LEGE 06072	10-09-2012	23-10-2012	1,7526
	24-01-2013	27-02-2013	1,1010
<i>Phormidium</i> sp. LEGE 06078	10-09-2012	24-10-2012	1,7947
	23-01-2013	27-03-2013	0,7850
<i>Planktothrix</i> sp. LEGE 08334	10-09-2012	22-10-2012	1,021
<i>Romeria aff. gracilis</i>	11-09-2012	23-10-2012	0,9406

LEGE 07310			
<i>Tolypothrix</i> sp.	11-09-2012	13-10-2012	0,2725
LEGE 11397	22-10-2012	29-11-2012	1,1543
<i>Romeria</i> sp.	11-09-2012	24-10-2012	0,5555
LEGE 06013			

Na segunda parte do trabalho, foram selecionadas vinte cianobactérias, sendo que 14 delas crescem em meio Z8, isto é, um meio de cultura para cianobactérias de água doce e salobra. Para além disso foram também selecionadas cianobactérias pertencentes à ordem *Nostocales* (Quadro 2.1). O procedimento usado para tratar estas estirpes foi semelhante àquele que foi usado para as primeiras estirpes, sendo que a única exceção foi que o meio Z8 não foi suplementado com 25 mg/ mL de NaCl.

O procedimento para a recolha da biomassa foi o mesmo adotado para as cianobactérias marinhas, isto é, foi tido em conta o tipo de crescimento sendo a biomassa recolhida por centrifugação ou através de uma rede de plâncton de malha até 15µm (Quadro 2.2).

É de salientar o facto de que se optou por abandonar todas as estirpes que cresciam em meio MN_B12 (*Gloeocapsopsis* cf. *crepidinum* 06123, *Synechocystis salina* 06155, *Chroococcopsis* sp. 07168, *Leptolyngbya saxicola* 07170 da primeira Fase; *Calothrix* sp. 07166, *Calothrix* sp. 06100, *Rivularia* sp. 07178, *Scytonema* sp. 07189, *Scytonema* sp. 07182), uma vez que o seu crescimento era demasiado lento e não se conseguia obter biomassa suficiente para realizar extracções suficientes, devido aos requisitos de extração.

2.2 Extratos

Para se proceder à extração dos metabolitos foi necessário ter um peso seco de cada estirpe de pelo menos 500 mg (0,5 g). Com a exceção de algumas estirpes, foi necessário esperar pelo crescimento de mais balões de 6L para se obter esta biomassa seca, uma vez que um balão não produzia biomassa suficiente para se proceder à extração. Esta situação verificou-se essencialmente para as estirpes usadas na Fase 1 do trabalho, isto é as estirpes marinhas.

2.2.1 Extratos

2.2.1.1 Extração orgânica

A extração dos compostos foi realizada segundo o protocolo adotado no LEGE (Leão et al., 2010). Assim sendo o processo decorreu da seguinte forma:

- 1) Montou-se o sistema como indicado na figura 2.1;

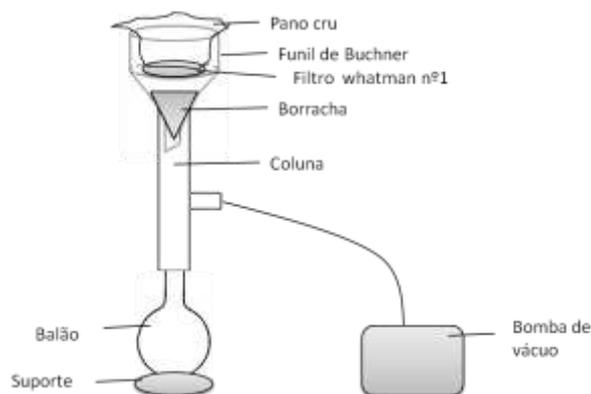


Figura 2.1: Sistema montado para extração

- 2) A partir da biomassa liofilizada, previamente pesada, adicionou-se uma solução de Diclorometano e Metanol numa proporção de 2:1, perfazendo um volume final de 30 mL. Depois de adicionada a solução à biomassa, esta ficou a extrair durante 30 minutos;
- 3) No final deste tempo, decantou-se a mistura fazendo-a passar pelo sistema montado e recolhendo o resultante (fase líquida) num balão de fundo redondo de 500 mL, sendo que o pano-cru foi também lavado com os esguichos de Diclorometano e Metanol;
- 4) Antes de começar outra extração, toda a biomassa que ficou retida no pano-cru foi também recolhida para ser novamente extraída;
- 5) Foram feitas mais 2 extrações à temperatura ambiente e mais três a 40°C, até que o líquido extraído se tornou translúcido²;
- 6) No final das extrações, o extrato resultante misturado com os solventes foi a evaporar num evaporador rotativo (Rotavapor);
- 7) O extrato seco foi ressuscitado no menor volume possível em Isooctano: Etanol (1:1) e transferido para um vial de 22mL previamente pesado;

² Exceção feita para *Leptolyngbya nodulosa* (LEGE 06120), *Gloeocapsopsis cf. crepidium* (LEGE 06123) e *Leptolyngbya saxicola* (07170) às quais se fizeram 11 e 7 extrações, respetivamente.

- 8) O vial foi seco em azoto gasoso e quando o extrato estava seco este foi pesado para saber qual a massa de extrato que havia sido extraída, usando a fórmula:

$$\text{Massa extrato(mg)} = \text{Massa vial 22mL(extrato)} - \text{Massa vial 22mL(vazio)}$$

No Quadro 2.3 pode-se ver qual a massa de extrato obtida por cada estirpe de cianobactérias.

2.2.1.2 Extração aquosa

Tal como a extração orgânica, a extração aquosa foi obtida a partir da biomassa liofilizada e depois de se proceder à extração orgânica.

- 1) O sistema foi o mesmo mudando-se apenas o balão de recolha, o pano-cru e o filtro;
- 2) Adicionou-se à biomassa 20 mL de água ultra-pura e deixou-se a extrair durante 30 minutos;
- 3) No final do tempo a mistura foi decantada fazendo-a passar pelo sistema;
- 4) Este processo repetiu-se 4 vezes;
- 5) O extrato resultante foi centrifugado para remover alguma biomassa e também algum solvente orgânico que poderia ter passado por não ter evaporado totalmente;
- 6) O extrato final foi então armazenado em frascos e congelado a -20°C para depois ser liofilizado;
- 7) O liofilizado foi passado para um vial de 22 mL para se obter a massa do extrato (procedimento igual ao anterior).

Quadro 2.3: Massa de extrato orgânico de cada estirpe

Estirpe e Código LEGE	Massa extrato orgânico (mg) ³
<i>Phormidium corium</i> LEGE 06007	450,3
<i>Leptolyngbya</i> sp. LEGE 06020	594,1
<i>Pseudanabaena</i> cf. <i>frigida</i> LEGE 06119	618,5

³ Para as estirpes marinhas, a massa de extrato mencionada apenas se refere à segunda parte do trabalho em que os extratos foram concentrados para 100 mg/mL.

<i>Leptolyngbya nodulosa</i> LEGE 06120	384,2
<i>Pseudanabaena</i> sp. LEGE 06145	233,8
<i>Synechococcus nidulans</i> LEGE 06156	338,4
<i>Cyanobium</i> sp. LEGE 06184	447,0
<i>Anabaena</i> sp. LEGE 03284	285,5
<i>Anabaena</i> sp LEGE 04288	129,4
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i> LEGE 03277	99,9
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i> LEGE 03278	136,6
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> LEGE 99043	106
<i>Nodularia</i> sp LEGE 06071	131
<i>Nostoc edaphicum</i> LEGE 07299	55,6
<i>Nostoc</i> sp. LEGE 06077	62,2
<i>Phormidium autumnale</i> LEGE 06222	135,7
<i>Phormidium</i> sp. LEGE 06072	190,4
<i>Phormidium</i> sp. LEGE 06078	250,6
<i>Planktothrix</i> sp. LEGE 08334	182,7 ⁴
<i>Romeria aff. gracilis</i> LEGE 07310	176,8

⁴ A estirpe havia produzido 205,8 mg de extrato, mas como se perdeu algum extrato usou-se este valor de 182,7 mg, visto que foi a partir desta massa que se retiraram os 100 mg para os ensaios.

<i>Tolypothrix</i> sp. LEGE 11397	145,9
<i>Romeria</i> sp. LEGE 06013	108,5

2.2.2 Fracionamento

Os fracionamentos foram feitos apenas para os primeiros ensaios com cianobactérias marinhas, visto que para os voltar a fazer era necessária muita mais biomassa, a qual não foi possível produzir.

- 1) A partir da massa de extrato conhecida, o extrato foi ressuspenso em Isoocano: Etanol (1:1) de forma a se obter uma concentração de 50 mg/mL aplicando a fórmula:

$$\text{Concentração Extrato (mg/mL)} = \frac{\text{Massa de extrato (mg)}}{50 \text{ (mL)}}$$

- 2) Cerca de 80% da massa de extrato foi passada para um vial de 7 mL que foi a secar em azoto gasoso, sendo que o extrato devia estar completamente seco antes de se proceder ao fracionamento;
- 3) Para se dar início ao fracionamento montou-se o sistema como indicado na figura 2.2;

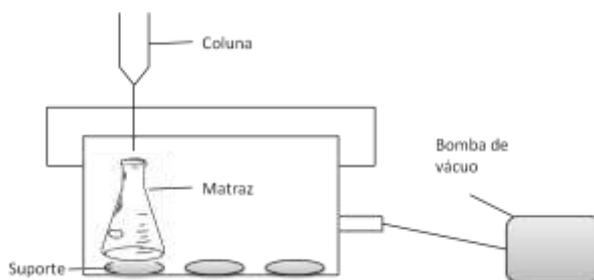


Figura 2.2: Sistema montado para fracionamento do extrato

- 4) A coluna de sílica foi acondicionada com a primeira solução de solventes com que se recolhe a fração A, isto é, 90% Hexano e 10% de Acetato de Etilo;
- 5) O extrato foi ressuspenso na mesma solução (90% Hexano e 10% Acetato de Etilo) e sonicado para se obter uma mistura homogénea e carregado na coluna;

- 6) A solução de solventes (90% Hexano e 10% Acetato de Etilo) foi sendo adicionada até a coloração amarela do extrato atingir 3/4 da coluna, momento a partir do qual se começou a recolher a fração para balões de fundo redondo de 100 mL;
- 7) Os solventes foram adicionados sequencialmente, aumentando a polaridade, e as frações foram recolhidas como indicado no Quadro 2.4;
- 8) No final do fracionamento, as frações foram evaporadas no evaporador rotativo (rotavapor) e ressuspendidas no menor volume possível de Isooctano: Etanol;
- 9) As frações foram então transferidas para vials de 7mL previamente pesados e depois secas em azoto gasoso. A fórmula para o cálculo da massa da fração foi:

$$\text{Massa Fração}(mg) = \text{Massa Vial 7mL(fração)} - \text{Massa Vial 7mL(vazio)}$$

Tanto as frações como o extrato bruto foram armazenados a -20°C até posterior utilização.

No Quadro 2.5 pode-se ver qual a massa de extrato fracionada e o tipo de coluna usada.

Quadro 2.4: Reagentes usados no fracionamento e frações recolhidas

		Coluna de 2g				Coluna de 5g			
		Hexano	Ac. Etilo	MetOH	Total	Hexano	Ac. etilo	MetOH	Total
Fração A	90% hexano 10% ac. Etilo	3600 μL	400 μL	0 μL	4 mL	9000 μL	1000 μL	0 μL	10 mL
	20% Ac. etilo em hexano	3200 μL	800 μL	0 μL	4 mL	8000 μL	2000 μL	0 μL	10 mL
	40% Ac. de etilo em hexano	2400 μL	1600 μL	0 μL	4 mL	6000 μL	4000 μL	0 μL	10 mL
Fracção B	60% Ac.de etilo em hexano	1600 μL	2400 μL	0 μL	4 mL	4000 μL	6000 μL	0 μL	10 mL
	80% Ac. de etilo em hexano	800 μL	3200 μL	0 μL	4 mL	2000 μL	8000 μL	0 μL	10 mL
	100% Ac. de etilo	0 μL	4000 μL	0 μL	4 mL	0 μL	10000 μL	0 μL	10 mL
	75% Ac. de etilo em metanol	0 μL	3000 μL	1000 μL	4 mL	0 μL	7500 μL	2500 μL	10 mL
Fração C	75% Metanol em ac. de etilo	0 μL	1000 μL	3000 μL	4 mL	0 μL	2500 μL	7500 μL	10 mL
	100% Metanol	0 μL	0 μL	4000 μL	4 mL	0 μL	0 μL	10000 μL	10 mL
	100% Metanol	0 μL	0 μL	4000 μL	4 mL	0 μL	0 μL	10000 μL	10 mL

Quadro 2.5: Massa de extrato fracionada e coluna de sílica usada

Estirpe	Código LEGE	Data do fracionamento	Massa extracto fraccionada	Coluna de sílica
<i>Phormidium corium</i>	06007	21-05-2012	100	5g
<i>Leptolyngbya</i> sp.	06020	10-01-2012	100	5g
		30-05-2012	90	5g
<i>Pseudanabaena</i> cf. <i>frigida</i>	06119	01-02-2012	120	5g
		15-05-2012	200	5g
<i>Leptolyngbya nodulosa</i>	06120	17-05-2012	100	5g
<i>Pseudanabaena</i> sp.	06145	22-05-2012	200	5g
<i>Synechocystis salina</i>	06155	25-04-2012	75	5g
<i>Synechococcus nidulans</i>	06156	19-01-2012	200	5g
		28-02-2012	150	5g
<i>Cyanobium</i> sp.	06184	02-02-2012	100	5g
		29-05-2012	110	5g
<i>Leptolyngbya saxicola</i>	07170	28-03-2012	30	2g
<i>Pseudanabaena</i> sp.	07185	25-04-2012	75	5g

2.2.3 Concentração dos extratos

Na primeira fase do trabalho decidiu-se testar os extratos a uma concentração de 1 mg/mL. Para isso, os extratos e frações foram ressuspensos em Isooctano: Etanol a uma concentração de 50 mg/ mL ou de 10 mg/ mL e foram transferidos para vials de 4 mL, 20 µL ou 100 µL, respetivamente, correspondendo este volume à transferência de 1mg de extrato ou fração para o vial de 4 mL. Antes de serem transferidos, os extratos e as frações foram sonicados para homogeneizar os extratos e para que desta forma o volume retirado fosse representativo.

Na segunda fase do trabalho decidiu-se aumentar a concentração dos extratos, tanto de cianobactérias de água salgada como de água doce para 100 mg/ mL. Assim sendo, foi transferido para cada vial 1 mL de extrato, correspondendo à transferência de 100 mg de extrato. Os extratos foram secos em azoto e armazenados a -20° C até serem usados posteriormente. Quando os extratos foram usados foi-lhes adicionado 1 mL de DMSO (Nostro et al., 2000) e para homogeneizar a amostra, estes foram sonicados e transportados para o outro laboratório.

2.3 Estirpes bacterianas

Para se testarem os extratos das cianobactérias selecionaram-se bactérias Gram-positivo e Gram- negativo, com o objetivo de alargar o espectro de microrganismos patogénicos a incluir para a avaliação do potencial antimicrobiano dos extratos.

Para tal, foram selecionadas 3 espécies microbianas (Quadro 9) incluindo, para algumas espécies, diferentes estirpes: referência e isolados de campo. As estirpes encontravam-se armazenadas em Água de Peptona com glicerol a - 20° C, tendo sido necessário proceder à sua revitalização:

- 1) Depois de descongelados os criotubos foram pipetados 60µL de cada criotubo para um *ependorf* com 1mL de APT (água peptonada tamponada) que foi a incubar a 37° C até se obter uma turvação superior a 0,5 McFarland;
- 2) A partir da suspensão descrita no ponto anterior, retiraram-se 5µL de inóculo e semeou-se por esgotamento num meio de cultura microbiológica específico: TBX (Tryptone Bile X-glucuronide para *Escherichia coli*); BD (Baird-Parker Agar para *Staphylococcus aureus*); SB (Slanetz and Bartley para *Enterococcus* spp.); HEA (Hectoen Enteric Agar para *Salmonella* spp.);
- 3) As placas ficaram a incubar na estufa a 37° C durante 24 h;
- 4) No final deste tempo, as placas que apresentavam crescimento eram retiradas da estufa e, em cada placa, com o auxílio da lupa era selecionada uma colónia típica isolada;
- 5) A colónia isolada era repicada com o auxílio de um fio reto, para uma placa de MH, deixando a placa a incubar a 37° C durante 24 h;
- 6) Após se verificar o crescimento em MH (Mueller-Hinton) , com a ajuda de uma zaragatoa estéril algumas das zonas do riscado eram passadas para criotubos com Água de Peptona e glicerol e armazenados a -20°C até uso posterior;

- 7) Quando no passo descrito no número 2) não se obtinha crescimento os *ependorfs* eram deixados mais tempo na estufa a 37° C, repetindo-se o procedimento até haver crescimento em placa.

Para as estirpes que não cresceram de nenhuma das maneiras acima descritas optou-se por abandonar e assumir que já não eram viáveis.

Na primeira fase do trabalho selecionaram-se três estirpes bacterianas multirresistentes (Quadro 2.6). Nesta fase ainda não foram testadas as estirpes de referência, com o objetivo de avaliar o potencial antimicrobiano dos extratos diretamente sobre estirpes isoladas a partir de amostras clínicas. Devido à multirresistência bacteriana, na fase seguinte optou-se por mudar apenas para estirpes de referência, visto que a multirresistência poderia levar à produção de falsos negativos, isto é, não se conseguia comprovar efetivamente se existia a produção de substâncias antibióticas (Quadro 2.7).

Quadro 2.6: Estirpes bacterianas selecionadas para a avaliação do potencial antimicrobiano dos extratos (primeira fase dos trabalhos)

Estirpe	Código	Gram	Resistência
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29 212	+	Referência
<i>Enterococcus faecium</i>	MO II	+	Multi- resistente
<i>Escherichia coli</i>	C 9/ 11	-	Multi- resistente
<i>Escherichia coli</i>	G 7/ 100	-	Multi- resistente
<i>Escherichia coli</i>	G Rib 102b1	-	Multi- resistente
<i>Escherichia coli</i>	RA B4/ 105	-	Multi- resistente
<i>Escherichia coli</i>	SA 1	-	Multi- resistente
<i>Salmonella</i> Enteritidis	CECT 4300	-	Referência
<i>Salmonella</i> Typhimurium	CECT 443	-	Referência
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25- 923	+	Referência

Quadro 2.7: Estirpes de referência selecionadas para a avaliação do potencial antimicrobiano dos extratos (segunda fase dos trabalhos)

Estirpe	Código	Gram
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 66 33	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29 212	+
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25 922	-
<i>Klebsiella pneumonia</i>	CL	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19 111	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27 853	-
<i>Salmonella Typhimurium</i>	CECT 443	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25 923	+

2.4 Avaliação do potencial antimicrobiano dos extratos

A avaliação do potencial antimicrobiano dos extratos foi efetuada com base no método de Kirby-Bauer (Bauer et al., 1966) usado na prática clínica para avaliação da susceptibilidade antimicrobiana dos isolados bacterianos. Para este efeito usaram-se discos de antibiograma brancos (Oxoid), ou seja, sem qualquer antibiótico impregnado para que se pudessem carregar os extratos. Na primeira fase do trabalho, os extratos foram dissolvidos em Isooctano: Etanol (1:1), mas como estes solventes estavam a interferir com o teste mudou-se o solvente para DMSO.

Os discos foram inicialmente carregados com 20 μ L de extrato bruto e fracionado, numa concentração inicial de 1mg/ mL, implicando que cada disco ficasse impregnado com 20 μ g de extrato (primeira fase). Numa fase posterior, os discos continuaram a ser carregados com 20 μ L de extrato bruto, mas desta vez como o extrato se encontrava a uma concentração de 100 mg/ mL o disco passou a ser carregado com 2 mg de extrato.

Foram também estabelecidos controlos positivos, selecionando antibióticos para os quais as bactérias testadas haviam mostrado sensibilidade (Quadro 2.8) e o controlo negativo consistia num disco impregnado com 20 μ L do solvente, neste caso Isooctano:Etanol (1:1) para os primeiros antibiogramas e, posteriormente, DMSO.

Uma vez que não se sabe se o extrato é termorresistente, as placas depois de inoculadas e os discos estarem nas suas posições (Figuras 2.3 e 2.4) ficaram cerca de 1,5 a 2 horas a 4^o C para permitir a difusão do extrato na placa de MH. Assim sendo,

se o extrato não fosse termorresistente permitia-se a sua difusão na placa, permitindo assim a formação de um halo de inibição caso o extrato contivesse alguma substância antibiótica (Kellam et al., 1989; Cannell et al., 1988).

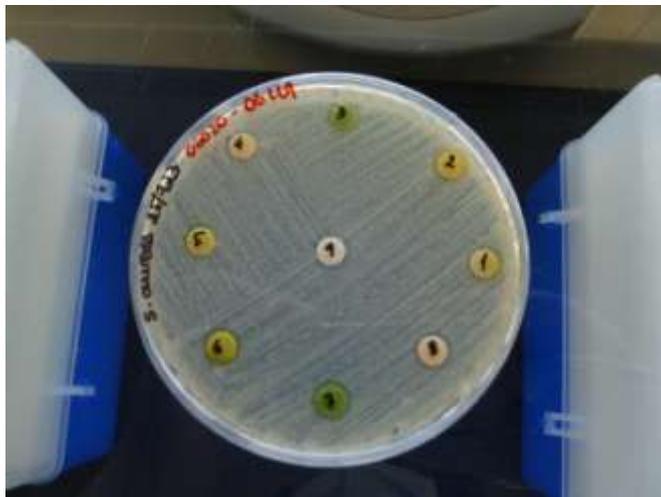


Figura 2.3: Avaliação do potencial antimicrobiano dos extratos para *S. aureus* ATCC 25 923 (no centro: controlo negativo)

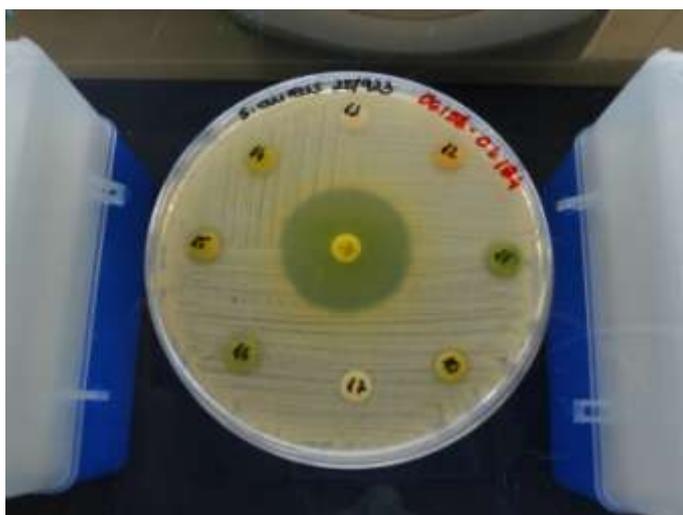


Figura 2.4: Potencial antimicrobiano dos extratos para *S. aureus* ATCC 25 923 (no centro: controlo positivo)

Quadro 2.8: Discos de antibiótico usados como controlos positivos para cada estirpe bacteriana

Estirpe bacteriana	Antibiótico (controlo positivo)
<i>Bacillus subtilis</i>	Ampicilina 10 µg
<i>Enterococcus</i> sp.	Nitrofurantína 300 µg
<i>Echerichia coli</i>	Imipenem 10 µg
<i>Staphylococcus aureus</i>	Nitrofurantína 300 µg
<i>Salmonella</i> Typhimurium	Ciprofloxacina 5 µg

Para além do método de difusão em disco, também se tentou o método da incorporação, conhecido por “*Pour Plate*”. Este método permitiria testar a sensibilidade usando uma maior quantidade de inóculo. Para estes testes usaram-se apenas duas estirpes bacterianas, *S. aureus* ATCC 25 923 e *Salmonella* Typhimurium CECT 443. Para testar o extrato, foram feitos poços nas placas de MH (já com a bactéria incorporada no meio) com o auxílio de uma pipeta de Pasteur de vidro (diâmetro do poço: 6 mm). A partir daqui foram feitas algumas modificações para que os resultados obtidos pudessem ser reprodutíveis. Uma das alterações feitas relacionou-se com a preparação do inóculo:

A) Método 1: uso de tubos de APT

- a. Para que pudessem ser incorporadas no meio, as bactérias foram repicadas da cultura stock, com a ajuda de uma ansa, para uma placa de MH usando a técnica de sementeira por esgotamento;
- b. Uma colónia isolada foi passada para um tubo de APT de 9 mL que ficou a crescer na estufa a 37° C *overnight*;
- c. No espectrofotómetro, a densidade ótica a 600 nm da suspensão foi ajustada para 0,1;
- d. A partir deste inóculo foram transferidos 400 µL para 80 mL de meio MH (exemplo de *S. aureus*);
- e. Depois de incorporada no meio foram transferidos 15 mL de meio para cada placa de Petri.

B) Método 2: uso de tubos de TS

- a. Uma colónia isolada de cada estirpe foi passada para um tubo de 9 mL de TS;
- b. No espectrofotómetro, a densidade ótica do inóculo foi ajustada para 0,1 a 600 nm;
- c. A partir do inóculo foram feitas três diluições 1:10, como indicado na Figura 2.5;
- d. Da diluição 10⁻³ retiraram-se 400 µL para se adicionarem a 80 mL de meio MH, neste caso para *S. aureus* (os restantes volumes podem ser consultados no Quadro 2.9);
- e. Depois de incorporado esse volume no meio, foram transferidos 15 mL de meio para cada placa de Petri.

Em virtude do primeiro método (1) implicar a existência de um número excessivo de células microbianas incorporadas no meio de cultura (MH), facto que

poderia diminuir a sensibilidade da técnica, foi necessário usar um inóculo mais diluído, conforme proporcionado pelo método 2.

Quadro 2.9: Volume de inóculo transferido para cada estirpe bacteriana para um volume de meio MH total de 80 mL

Estirpe bacteriana	Volume de inóculo (μL)
<i>Bacillus subtilis</i>	800
<i>Enterococcus faecalis</i>	400
<i>Escherichia coli</i>	600
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	600
<i>Listeria monocytogenes</i>	500
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	600
<i>Salmonella Typhimurium</i>	800
<i>Staphylococcus aureus</i>	400

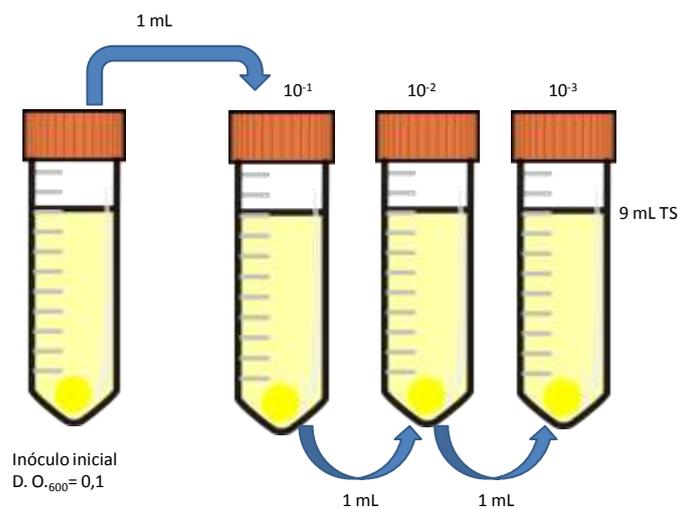


Figura 2.5: Diluições seriadas

Verteu-se em cada placa de Petri 15 mL de meio (MH), visto ter sido esse volume que permitia formar poços que eram preenchidos na totalidade pelos 50 μL de extrato, permitindo assim que este se difundisse de forma uniforme pelo meio de cultura.

Depois de carregar o extrato, as placas permaneceram à temperatura ambiente durante duas horas e depois foram incubadas a 37° C durante 24 h.

Foram também feitas algumas alterações a este método, devido ao crescimento em superfície das bactérias. Assim sendo, após verter nas placas de Petri o meio MH com a bactéria incorporada e este ter solidificado:

1. Espalharam-se mais 10 mL de meio MH sem bactéria incorporada e só depois foram feitos os poços nas placas;
2. Depois de terem sido feitos os poços e de os ter preenchido com os extratos, foram adicionados mais 10 mL de meio MH por cima.

A avaliação do potencial antibacteriano dos extratos fez-se usando uma circunferência com 1,5 cm de diâmetro e contando as colónias que se encontravam dentro desse perímetro. Uma vez que os extratos não formavam halos de inibição, consideraram-se positivos, isto é, com potencial antibacteriano, os extratos que influenciaram a distribuição das colónias bacterianas à volta do poço (maior afastamento) e também alterações no seu tamanho, em relação às colónias do resto da placa.

2.5 Potencial Sinérgico

Para testar o potencial sinérgico dos extratos que revelaram potencial antibacteriano usaram-se isolados clínicos e ambientais multirresistentes de *Enterococcus faecium* (resistente à Vancomicina), *S. aureus* (resistente à Oxacilina) e *E. coli* (resistente à Ciprofloxacina). Devido à limitação da quantidade de extrato que era carregado no disco de antibiótico, fizeram-se dois poços à volta do disco impregnado com antibiótico, de modo a reforçar a quantidade de extrato na placa. Também foram adicionados dois discos de antibiótico, sem qualquer extrato e que, tal como os poços, se encontravam a distâncias diferentes (0,3 cm e 0,5 cm). O distanciamento, tanto dos poços como dos discos, permitiam observar se existiam também alterações significativas entre o poço e o disco de antibiótico.

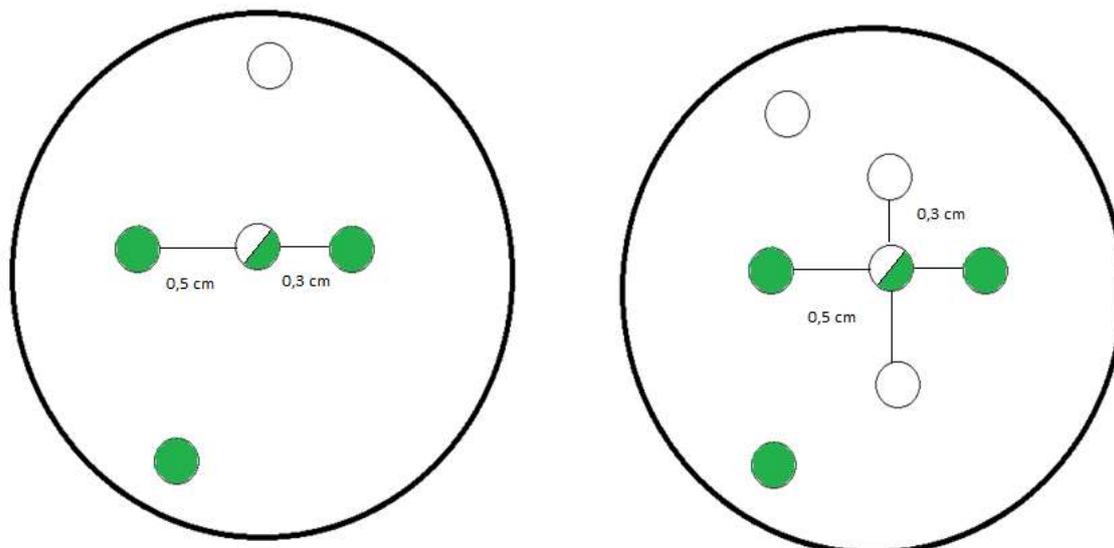


Figura 2.6: Teste de Sinergismo (Branco: disco de antibiótico; Verde: poço com 50 μ L de extrato; Verde/ Branco: disco de antibiótico carregado com 20 μ L de extrato).

Resultados

Neste trabalho não se procedeu à extração dos metabolitos das estirpes marinhas mencionadas no Quadro 9, visto que o seu crescimento foi demasiado lento e não foi possível obter biomassa suficiente para extração. Também a estirpe *Pseudanabaena* sp. (LEGE 07185) não produziu biomassa passível de ser extraída, sendo que este fenómeno deu-se na segunda fase do trabalho. É também importante salientar que os extratos aquosos não puderam ser testados, visto que foram sujeitos a contaminações no liofilizador e devido ao baixo rendimento da extração das estirpes.

Nos testes de difusão em disco, a concentração de 1 mg/ mL revelou ser muito baixa, visto que em cada disco estavam a ser carregados apenas 20 μ g tanto de extrato bruto como fracionado. Nestes primeiros ensaios usaram-se dois tipos de solventes, sendo que, inicialmente se usou uma solução de Isooctano e Etanol, numa proporção de 1:1. Uma vez que a solução estava a interferir com o ensaio (Figura 3.1), pois provoca por si só inibição de crescimento bacteriano optou-se por mudar para DMSO, solvente que revelou não interferir com os ensaios (Figura 3.2).

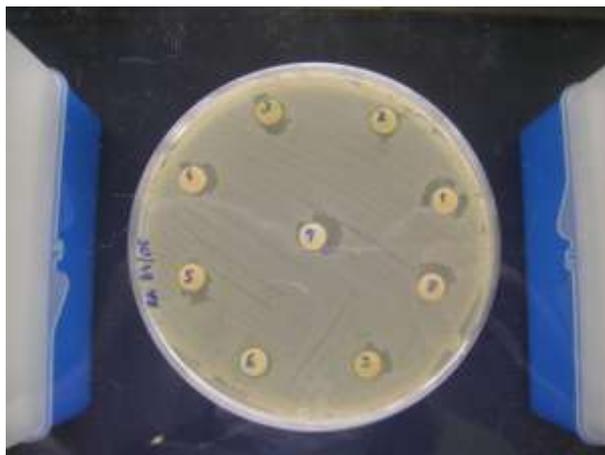


Figura 3.1: Antibiograma de *E. coli* RA B4/ 105. O disco 9 (controle negativo) mostra a interferência do Isooctano: Etanol

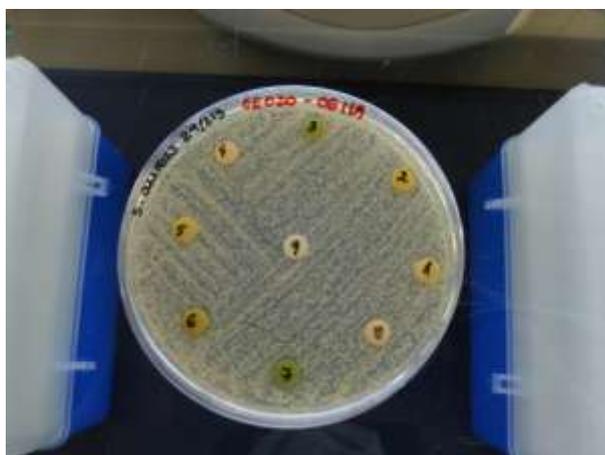


Figura 3.2: Antibiograma de *S. aureus* 29 213. O disco 9 (controle negativo) mostra que não há interferência do DMSO

Nesta primeira fase, todos os antibiogramas realizados para *E. coli* (G 7/100 e SA1), *Enterococcus faecalis* (MO e MO 29 212), *Enterococcus faecium* (MOII), *S. aureus* (ATCC 25 923 e ATCC 29 213) e *Salmonella* Typhimurium (CECT 443) produziram resultados negativos, motivo pelo qual se mudou a estratégia de trabalho. No Quadro 3.1 pode-se consultar quais as cianobactérias testadas e os respetivos resultados.

Quadro 3.1: Resultado Antibiogramas

Cianobactéria (Código LEGE)	Presença de bioatividade	Ausência de bioatividade	Controlo positivo	Controlo negativo
06007	-	<i>Enterococcus</i> sp.	+	-
06020	-		+	-
06119	-		+	-
06120	-		+	-

06123	-	<i>E. coli</i>	+	-
06145	-		+	-
06184	-	<i>S.aureus</i>	+	-
07170	-		+	-
07185	-		+	-

Controlo positivo: antibiótico diferente para cada estirpe bacteriana; Controlo negativo: DMSO

Assim sendo, para além de alargar o espetro de cianobactérias abrangidas foram também incluídas cianobactérias de água doce pertencentes às mesmas Ordens que as cianobactérias marinhas e alargando também para a Ordem *Nostocales*, aumentou-se a concentração do extrato para 100 mg/ mL, sendo assim carregado no disco 2 mg de extrato. Para além disso, os antibiogramas foram feitos usando apenas estirpes bacterianas de referência, uma vez que a sua sensibilidade é grande e conhecida.

Nos primeiros ensaios desta segunda fase, foram testadas apenas cinco estirpes de referência: *Bacillus subtilis* (ATCC 66 33), *E. coli* (ATCC 25 922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29 212), *S. aureus* (ATCC 25 923) e *Salmonella* Typhimurium (CECT 443). No teste de difusão em disco devido à elevada massa de extrato usada (2 mg/ disco), o disco não foi capaz de suportar a quantidade de extrato e verteu (Figura 3.3). Através da observação na lupa, pôde-se constatar que apesar dos discos terem vertido, as bactérias foram capazes de crescer por cima do extrato, com exceção de alguns casos em que o extrato chegou a inibir o crescimento bacteriano, mas apenas na zona mais próxima do disco. Pôde-se descartar a hipótese de ter sido efeito do solvente, neste caso DMSO, uma vez que o controlo negativo reproduziu resultados negativos (Quadro 3.2). Nos ensaios seguintes deu-se especial atenção aos extratos de *Anabaena* sp. (LEGE 04288), *Phormidium autumnale* (LEGE 06222), *Phormidium* sp. (LEGE 06072 e LEGE 06078) e *Tolypothrix* sp. (LEGE 11397).

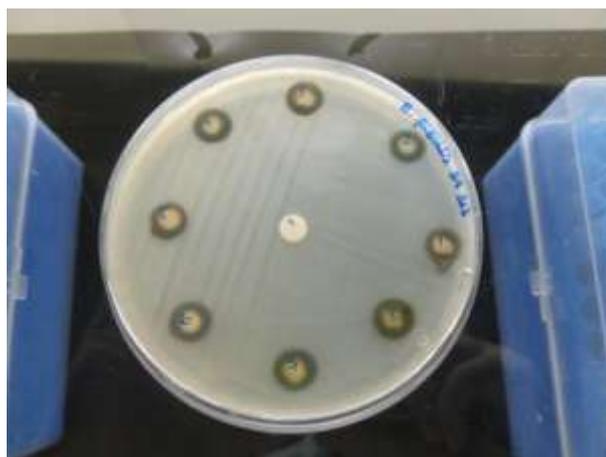


Figura 3.3: Antibiograma de *E. faecalis* 29 212. Os discos não estão completamente impregnados

Quadro 3.2: Resultado dos antibiogramas segundo o método da difusão em disco (2 mg/ disco para cianobactérias de água doce)

Cianobactéria (Código LEGE)	Presença de bioatividade	Ausência de bioatividade	Controlo positivo	Controlo negativo
04288	-	<i>B. subtilis</i>	+	-
03277	-		+	-
03278	-	<i>E. faecalis</i>	+	-
99043	-		+	-
06071	-	<i>E. coli</i>	+	-
06222	-		+	-
06072	-	S. Typhimurium	+	-
06078	-		+	-
07310	-		+	-
06013	-	<i>S. aureus</i>	+	-
11397	-		+	-

Controlo positivo: disco de antibiótico; Controlo negativo: DMSO

Dados os resultados negativos, optou-se por testar outro método, o método da incorporação, *Pour Plate*, e deste método também se fizeram algumas alterações para que os resultados fossem claros e reproduzíveis. Inicialmente as bactérias haviam ficado a crescer *overnight* em meio APT, mas devido ao crescimento excessivo da bactéria tinham de ser feitas várias diluições, o que tornava mais difícil a medição da OD a 600 nm. Por isso, escolheu-se transferir a bactéria para meio TS, que não permitia o crescimento excessivo das bactérias, o que tornava mais fácil a sua leitura no espectrofotómetro.

De todos os métodos que se testaram o que produziu melhores resultados foi o da incorporação e adição de meio MH sem inóculo por cima. Com este método tornou-se mais fácil a contagem das bactérias, visto que todas as bactérias estavam incorporadas no meio, não tendo havido crescimento na superfície do meio. Apesar de o poço não ficar completamente preenchido, dado que foi adicionada uma camada de meio sem inóculo, o extrato foi suficiente para preencher o meio com o inóculo incorporado.

Nos ensaios de Pour Plate usaram-se as estirpes *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29 212), *Escherichia coli* (ATCC 25 922), *Klebsiella pneumoniae* (CL), *Listeria monocytogenes* (19 111), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27 853), *Salmonella typhiurium* (CECT 443) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25 923).

A avaliação do potencial antibiótico foi feita através da contagem de colónias à volta do poço e a observação da sua distribuição num perímetro delimitado com 1,5 cm de diâmetro, visto que devido aos extratos serem brutos não produziram halos de inibição, mas apenas algumas diferenças na distribuição das colónias e também no seu tamanho na proximidade do poço. No Quadro 3.3 estão as contagens de colónias para as estirpes de água doce e no Quadro 3.4, as contagens para as estirpes marinhas.

Quadro 3.3: Contagem do número de colónias com extratos de cianobactérias de água doce (Método de *Pour Plate*)

Estirpe	Código	03284	04288	03277	03278	99043	06071	07299	06077 ^b	06222	06072	06078	08334	07310	11397	06013	DMSO
<i>B. subtilis</i>	ATCC 66 33	126	41*	120	85*	114	42*	119	124	120	93*	116	----	132	95*	121	107
<i>E. faecalis</i>	ATCC 29 212	>300	276	271	270	229*	239*	288	275	>300	>300	>300	281	>300	282 ⁶	288	251
<i>E. coli</i>	ATCC 25 922	216*	237	226*	236	227	251	196	162*	239	295	279	----	298	265	253	279
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CL	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	272*	>300	>300	>300	>300	>300	>300	286*	294
<i>L. monocytogenes</i>	19 111	>300	250	300	>300	>300	>300	----	>300	>300	>300	>300	----	>300	276*	>300	>300
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27 853	>300	236*	300	257*	>300	238*	259*	155	252*	241*	256*	----	265*	278*	>300	>300
<i>S. typhimurium</i>	CECT 443	>300	286*	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
<i>S. aureus</i>	ATCC 25 923	142	88*	105	91*	71*	66*	148	114	98*	99*	99*	92*	119	124	143	152

*: Extratos com potencial antibiótico, com base no número e aspeto das colónias

⁵ Extrato contaminado por bactéria Gram + esporulada⁶ Colónias entre o halo de inibição e o perímetro delineado.

Quadro 3.4: Contagem do número de colónias com extratos de cianobactérias marinhas (Método de *Pour Plate*)

Estirpe	Código	06184	06156	06120	06020	06007	06119	06145
<i>B. subtilis</i>	ATCC 66 33	100*	111	137	108	151	110	88*
<i>E. faecalis</i>	ATCC 29 212	278	260	264	249*	282	279	264
<i>E. coli</i>	ATCC 25 922	221	206*	199*	197*	231	201*	188*
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CL	>300	>300	298*	>300	>300	>300	>300
<i>L. monocytogenes</i>	19 111	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27 853	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
<i>S. Typhumurium</i>	CECT 443	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
<i>S. aureus</i>	ATCC 25 923	96*	135	98*	84*	108	95*	140

*: Extratos com potencial antibiótico, com base no número e aspeto das colónias.

Como já foi referido, nenhum dos extratos produziu um halo de inibição notório à exceção de *Tolipothrix* sp. (LEGE 11397) que para *Enterococcus faecalis* produziu um halo de inibição com 8,45 mm de diâmetro, sendo este o único resultado claramente positivo (Figura 3.4). Apesar do halo não ter nenhuma colónia, leu-se o número de colónias no perímetro estabelecido.



Figura 3.4: halo de inibição produzido por *Tolypothrix* sp., LEGE 11397 em *E. faecalis*

É importante salientar que o extrato de *Nostoc* sp. (LEGE 06077) estava contaminado com uma bactéria Gram-positiva esporulada (confirmação por coloração Gram e espalhamento de 50 μ L de extrato em placa de MH, Figura 3.5), visto que à volta do poço e na superfície do MH cresceu uma estrutura de cor esbranquiçada que não permitia a contagem das colónias, sendo por isso de notar que para algumas estirpes, como por exemplo para *P. aeruginosa*, existiu uma diminuição significativa do número de colónias (155 colónias quando o controlo tem uma contagem superior a 300 colónias). Este fenómeno foi mais evidente em *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa* e *S. Typhimurium*, com a diminuição do número de colónias visíveis, não tendo sido tão evidente para *B. subtilis* e *S. aureus* (Figura 3.6).



Figura 3.5: Crescimento de bactéria Gram-positiva esporulada em meio MH após o espalhamento de 50 μ L de extrato



Figura 3.6: A- Crescimento da bactéria à volta do poço em *P. aeruginosa*; B- Sem crescimento da bactéria à volta do poço de *B. subtilis*

O controlo negativo (DMSO) revelou que o solvente não estava a interferir com os ensaios, visto que também não se formou nenhum halo de inibição à volta do poço e é também importante salientar que não se observaram alterações no tamanho das colónias nem na sua distribuição à volta do poço, isto é, não se observou um maior número de colónias na zona mais afastada do poço. Apenas para as estirpes *E. faecalis*, *E. coli* e *K. pneumoniae* a contagem de colónias do controlo negativo foi inferior à contagem de colónias de alguns extratos, mas como foi referido anteriormente não se verificaram alterações no tamanho e distribuição das colónias à volta do poço.

De todos os extratos testados alguns parecem ter um maior potencial antibiótico, visto que o tamanho e distribuição das colónias na placa, e mais concretamente no perímetro delimitado, eram diferentes das restantes colónias incorporadas. De todos os extratos os que mostraram ser capazes de produzirem esses efeitos foram os extratos de cianobactérias de água doce *Nostoc edaphicum* (LEGE 07299) em *P. aeruginosa*, *B. subtilis* e *E. coli*, *Aphanizomenon flos-aquae* (LEGE 03277) em *E. coli*, *Aphanizomenon flos-aquae* (LEGE 03278) em *S. aureus*, *Planktothrix* sp. (LEGE 08334) em *E. faecalis* e *S. aureus*, *Romeria* sp. (LEGE 06013) *K. pneumoniae*, *Anabaena* sp. (LEGE 03284) em *E. coli*, *Anabaena* sp. (LEGE 04288) em *S. aureus* e *B. subtilis*, *Phormidium autumnale* (LEGE 06222) em *S. aureus*, *Phormidium* sp. (LEGE 06072) em *S. aureus*, *Phormidium* sp. (LEGE 06078) em *S. aureus*, *Tolipothrix* sp. (LEGE 11397) em *E. faecalis*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*, *Cylindrospermopsis raciborskii* (LEGE 99043) em *S. aureus* e *Nodularia* sp. (LEGE 06071) em *S. aureus* e *B. subtilis* e os extratos de cianobactérias marinhas *Leptolynbya* sp. (LEGE 06020) em *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *E. coli* e *S. aureus*, *Pseudanabaena* sp. (LEGE 06119) em *P. aeruginosa*, *Synechococcus nidulans* (LEGE 06156) em *P. aeruginosa*, *Cyanobium* sp. (LEGE 06184) em *E. faecalis* e *S. aureus*,

Leptolyngbya nodulosa (LEGE 06120) em *K. pneumoniae*, *E. coli* e *S. aureus* e *Pseudanabaena* sp. (LEGE 06145) em *B. subtilis* e *E. coli* (Figuras em Anexo). Nos Quadros 3.3 e 3.4 estão assinalados os extratos que demonstram ter potencial antibiótico, visto que têm uma contagem significativamente inferior ao controlo com DMSO.

Após comprovar a existência de substâncias com potencial antibiótico, fizeram-se mais alguns ensaios para testar o seu potencial sinérgico com antibióticos comerciais, isto é, substâncias puras. Neste tipo de ensaios pretendia-se usar bactérias multirresistentes e, por isso, os antibióticos selecionados foram aqueles para as quais as bactérias apresentaram resistência.

Quadro 3.5: Sinergismo entre extratos de cianobactérias (marinhas e de água doce) e antibióticos comerciais para *Enterococcus faecium* A5/ 102

	LEGE 11397	LEGE 06020
Disco impregnado com extrato	27	230
Poço a 0,3 cm	177	>300
Poço a 0,5 cm	203	>300
Controlo antibiótico	235	283
Controlo extrato	--- ⁷	>300

Quadro 3.6: Sinergismo entre extratos de cianobactérias (marinhas e de água doce) e antibióticos comerciais para *E. coli* G9/ 101

	LEGE 06020	LEGE 03284	LEGE 06145	06120
Disco impregnado com extrato	216	143	163	143
Poço a 0,3 cm	196	159	156	152
Poço a 0,5 cm	196	134	162	118
Controlo antibiótico	240	201	213	211
Controlo extrato	177	157	185	192

⁷ Não foi feito controlo com extrato, visto que o volume era inferior a 50 µL e ensaios anteriores (não referidos no trabalho) já se havia comprovado a eficácia do extrato.

Quadro 3.7: Sinergismo entre extratos de cianobactérias (marinhas e de água doce) e antibióticos comerciais para *S. aureus* 46/ 60

	LEGE 06184	LEGE 06020	LEGE 06071	LEGE 06119	LEGE 06120	LEGE 04288
Disco impregnado com extrato	225	257	220	221	196	233
Poço a 0,3 cm	252	257	237	221	195	209
Poço a 0,5 cm	263	250	242	242	150	215
Controlo antibiótico	274	257	280	282	244	268
Controlo extrato	>300	296	272	207	239	272

De todas as estirpes testadas destaca-se os efeitos notados em *E. faecium* A5/102, visto que mostram dois resultados completamente opostos, mas igualmente importantes. Em *Tolypothrix* sp. (LEGE 11397) existe um claro sinergismo entre o extrato e o antibiótico, neste caso Vancomicina, tendo-se até formado um halo de inibição passível de ser medido (disco impregnado com extrato com halo de 13, 24 mm e disco de Vancomicina com 12, 54 mm). Também o próprio extrato formou um halo de inibição de 9,38 mm. A contagem das colónias confirmou esta observação, sendo que as colónias estão bastante afastadas do poço e também são mais pequenas em comparação com o resto da placa. Em *Leptolyngbya* sp. (LEGE 06020) existe um claro antagonismo entre o antibiótico e o extrato, visto que cresceram colónias de *E. faecium* mesmo na zona em que o antibiótico ainda deveria ter algum efeito.

Discussão

A escolha do método adequado para a difusão dos extratos e os organismos teste é muito importante, em virtude da sensibilidade do método poder alterar os resultados. A escolha dos organismos adequados é também importante, já que estes devem estar bem caracterizados, através de antibiograma, e devem abranger tanto

bactérias Gram- positivo como bactérias Gram- negativo. Os controlos escolhidos devem ser também adequados, devendo-se haver sempre um controlo positivo e outro negativo (Cos et al., 2006).

Na fase inicial do trabalho optou-se por usar o método da difusão em disco, já usado para extratos de cianobactérias em trabalhos anteriores (Kreitlow et al., 1999; Martins et al., 2008; Semary, 2011), com uma concentração de 20 µg/ disco. Visto se tratarem de extratos muito complexos, isto é, serem extratos pouco fracionados e de ainda terem muitos compostos diferentes misturados, a concentração usada foi muito baixa, levando à obtenção de resultados negativos. O aumento da concentração dos extratos foi o passo seguinte, passando a usar-se uma concentração de 2 mg/ disco. No entanto, a alteração revelou um importante inconveniente: o disco revelou ser ineficaz na absorção do volume de extrato necessário e também a difusão na placa que não foi conseguida, mesmo estando as placas inoculadas e com os discos carregados entre 1,5 a 2 h a 4° C antes de irem a incubar na estufa a 37° C. Posteriormente optou-se por realizar os ensaios através da difusão em poços na placa, deixando as placas à temperatura ambiente durante 2 horas para permitir a difusão dos extratos (Bloor et al., 1989; Cannel et al., 1988; Kellam et al., 1989).

Após os ensaios iniciais terem revelado resultados negativos, decidiu-se aumentar o espectro de cianobactérias abrangidas e foram também cultivadas para extração cianobactérias de água doce, tendo em consideração que as estirpes da Ordem *Nostocales* são mais diferenciadas do que as estirpes da Ordem *Chroococcales* (Waterbury, 2006).

A opção de realizar os ensaios através da difusão em poços nas placas revelou ser mais promissora, visto que usando uma concentração de 5 mg/ poço conseguiram-se observar inibições significativas para em alguns extratos. Smânia- Jr. et al. (2007) fez a comparação entre o método da difusão em disco e o método da difusão em poço, usando concentrações iguais. Tanto para *S. aureus* como para *E. coli*, o método da difusão em poço revelou ser mais sensível, produzindo maiores zonas de inibição do que aquelas conseguidas para o método da difusão em disco.

De todos os extratos testados aquele que parece ter um maior potencial antibiótico é o da estirpe de cianobactérias de água doce *Tolipothrix* sp. (LEGE 11397), visto que ter sido o único extrato a produzir um halo de inibição notório mediante observação com vista desarmada. Burja et al. (2001) cita Prinsep et al. (1992) e mostra que *Tolipothrix nodosa*, estirpe marinha, é produtora de uma

substância antibiótica, a Toliporfina (classe química: pirrol). Para esta estirpe não foi possível calcular a sua concentração inibitória mínima (MIC), uma vez que a sua cor escura e quantidade de *stock* de extrato não permitiram a realização deste tipo de ensaios. Outro fator importante é também a concentração à qual os extratos foram testados ser demasiado elevada para realizar ensaios em microplaca, o que poderia levar à obtenção de falsos negativos.

As estirpes *Nostoc edaphicum* (LEGE 07299), *Aphanizomenon flos-aquae* (LEGE 03277), *Aphanizomenon flos-aquae* (LEGE 03278), *Planktothrix* sp. (LEGE 08334), *Romeria* sp. (LEGE 06013), *Anabaena* sp. (LEGE 03284), *Anabaena* sp. (LEGE 04288), *Phormidium autumnale* (LEGE 06222), *Phormidium* sp. (LEGE 06072), *Phormidium* sp. (LEGE 06078), *Tolipothrix* sp. (LEGE 11397), *Cylindrospermopsis raciborskii* (LEGE 99043), *Nodularia* sp. (LEGE 06071), *Leptolyngbya* sp. (LEGE 06020), *Pseudanabaena* sp. (LEGE 06119), *Synechococcus nidulans* (LEGE 06156), *Cyanobium* sp. (LEGE 06184), *Leptolyngbya nodulosa* (LEGE 06120) e *Pseudanabaena* sp. (LEGE 06145) produziram também efeitos em algumas bactérias, apesar de não haver um halo de inibição notório, foram registadas alterações significativas ao nível do tamanho e distribuição das colónias na placa, em função da posição do extrato na placa.

Tendo em consideração as estirpes de cianobactérias que neste trabalho revelaram potencial antibiótico, algumas estirpes do Género *Nostoc* tinham já demonstrado serem capazes de produzir compostos com potencial antibiótico. Jaki et al. (1999) isolou da cianobactéria *Nostoc commune* (estirpe terrestre) um diterpenóide extracelular, Noscomina, capaz de atuar contra *B. cereus*, *S. epidermidis* e *E. coli*. Bloor et al. (1989) também testou o potencial antibiótico de *Nostoc muscorum*. Esta estirpe mostrou uma atividade antimicrobiana de espectro alargado, visto ser capaz de impedir o crescimento de bactérias Gram- positivo (*S. aureus* multirresistente, *B. circulans*), Gram- negativo (*P. aeruginosa*, *Proteus vulgaris*) e fungos leveduriformes (*Candida pseudotropicalis*).

Fish et al. (1994) testou a estirpe *Phormidium* sp., proveniente dos Açores, que também mostrou produzir um composto antibiótico de espectro alargado contra bactérias Gram- positivo (*Bacillus cereus*, *S. aureus*), Gram- negativo (*E. coli*, *Pseudomonas denitrificans*) e fungos leveduriformes (*Candida albicans*). Neste estudo, uma condição que determina a produção do composto com potencial antibiótico é a temperatura. Noutro estudo de Fish et al. (1994), usando também uma estirpe de *Phormidium*, aponta que as concentrações de nutrientes são também determinantes

na produção de compostos bioativos e que, dependendo das condições de cultura, podem ser produzidos vários compostos com propriedades semelhantes. Smary (2011) comprovou que o perfil dos extratos, isto é, a produção de compostos antibióticos, muda consoante as concentrações de fosfato. Seria importante em ensaios futuros tentar também definir este perfil para as estirpes que demonstram ter potencial antibiótico, mas o mesmo pode ser aplicado às estirpes que não demonstraram ter qualquer tipo de potencial, visto que as condições de cultura podem não ter sido adequadas à produção desse tipo de compostos.

Apesar de não se poder fazer uma comparação direta entre a produção de compostos com potencial antibiótico entre cianobactérias de água doce e cianobactérias marinhas, visto que foram analisados 15 extratos das primeiras e apenas 7 das segundas, as cianobactérias da Ordem *Nostocales* têm um maior espectro de ação do que as cianobactérias da Ordem *Oscillatoriales*, isto é, são capazes de inibir o crescimento de várias bactérias Gram- positivo e Gram- negativo, enquanto as pertencentes à Ordem *Oscillatoriales* não têm um espectro de ação tão alargado. Valdor et al. (2007) verificou este pressuposto com extratos de cianobactérias (*Oscillatoria* sp., *Rivularia biasolettiana*, *Rivularia haematites*, *Geitlerinema splendidum*, *Phormidium* sp., *Tolipothrix distorta* e *Scytonema myochrous*) e microcistinas puras, isto é, estirpes da Ordem *Nostocales* têm resultados mais promissores do que as estirpes da Ordem *Oscillatoriales*. Para além do maior grau de diferenciação das estirpes da Ordem *Nostocales*, outra explicação será também a função biológica destes metabolitos produzidos pelas cianobactérias.

Martins et al. (2008) demonstrou também que algumas estirpes de *Synechococcus* são capazes de produzir compostos com potencial antibiótico. Não é possível fazer uma comparação direta para a maior parte das cianobactérias, visto que não se tem uma confirmação da espécie que se trata e para isso ter-se-ia de fazer uma análise molecular e analisar o segmento 16S rRNA e definir desta forma a espécie.

Os sinergismos entre antibióticos são importantes, visto que é mais difícil as bactérias adquirirem resistências quando são tomados ao mesmo tempo dois antibióticos (Dancer, 2004). Nos ensaios realizados para *Enterococcus faecium* (A5/102) resistente à vancomicina, a adição de extrato (LEGE 11397) ao disco de antibiótico revelou uma atividade sinérgica entre os dois compostos. Resultados semelhantes foram encontrados para extratos de agrião, em que a atividade

antimicrobiana aumentava quando se combinava o antibiótico com o extrato e compostos puros (Freitas et al., 2013).

Como já foi referido anteriormente, estes compostos têm uma função ecológica, de momento desconhecida. Seria, por isso, importante testar num microcosmos semelhante ao meio natural os efeitos destes compostos, isto é, crescer cianobactérias e bactérias em conjunto (co-crescimento) e verificar o crescimento de cada uma. Desta forma, poder-se-ia avaliar se as cianobactérias são neste caso capazes de inibir o crescimento das bactérias (Bomo et al., 2012).

Conclusões

Atualmente a resistência a antibióticos é um dos maiores problemas na medicina humana e veterinária, visto que os princípios da Medicina moderna se baseiam na toma de antibióticos para curar infeções que estão subjacentes a vários procedimentos clínicos. Porém as emergências de resistências aos antimicrobianos tem-se revelado a um ritmo muito acima do verificado na descoberta de novas substâncias, prevendo-se para um futuro próximo o esgotamento do arsenal terapêutico, e um regresso trágico a um era pré-antibiótica. É necessário, por isso, encontrar soluções viáveis. A investigação de novos compostos produzidos por organismos vivos como as cianobactérias pode ter efeitos promissores e ser uma das soluções encontradas para resolver este problema.

Como já foi referido anteriormente, a escolha do método a usar deve ter em conta o tipo de compostos que se pretendem testar e também os organismos teste, de forma a evitar falsos positivos ou falsos negativos.

Neste trabalho conseguiu-se provar que tanto cianobactérias de água doce como marinhas são capazes de produzir compostos com potencial antibiótico. Também se conseguiu provar que estes compostos podem ser usados em conjunto com antibióticos já existentes e que mostravam já não produzir qualquer efeito, atuando assim de forma sinérgica. Este último ponto é de certa forma importante, visto que se podem “reutilizar” os antibióticos que já haviam deixado de ter efeito e assim tentar diminuir a resistência que as bactérias possam adquirir.

Apesar de não se ter obtido um halo de inibição, mas uma diminuição da quantidade e tamanho do número de colónias, é importante salientar que os extratos afetaram o crescimento de bactérias Gram- positivo e Gram- negativo. De todos os

extratos destacam-se os extratos de *Anabaena* sp. (LEGE 04288), *Aphanizomenon flos-aquae* (LEGE 03278), *Nodularia* sp. (LEGE 06071), *Phormidium autumnale* (LEGE 06222), *Phormidium* sp. (LEGE 06072), *Phormidium* sp. (LEGE 06078), *Tolypothrix* sp. (LEGE 11397), *Leptolyngbya* sp. (LEGE 06020), *Pseudanabaena* sp. (LEGE 06119), *Leptolyngbya nodulosa* (LEGE 06120) e *Pseudanabaena* sp. (LEGE 06145), visto que estas estirpes apresentam capacidade de inibir o crescimento de bactérias Gram-positivo e Gram-negativo, isto é, têm um espectro alargado de ação. Os extratos de *Anabaena* sp. (LEGE 03284), *Aphanizomenon flos-aquae* (LEGE 03277), *Nostoc edaphicum* (LEGE 07299), *Romeria* sp. (LEGE 06013), *Romeria* aff. *gracilis* (LEGE 07310) e *Synechococcus nidulans* (LEGE 06156) inibiram o crescimento de bactérias Gram-negativo. Por outro lado, as estirpes *Cylindrospermopsis raciborskii* (LEGE 99043), *Planktothrix* sp. (LEGE 08334) e *Cyanobium* sp. (LEGE 06184) inibiram mais eficazmente o crescimento de bactérias Gram-positivo. A descoberta de antibióticos com ação mais restrita, como é o caso dos extratos mencionados, é também importante, visto que o uso destes antibióticos em sinergismo com outros pode levar à diminuição da resistência aos antibióticos, como referido na Introdução.

É, por isso, importante encontrar sinergismos entre antibióticos e perceber como estes podem funcionar. Como se conseguiu provar, o uso de substâncias sinérgicas leva à “revitalização” de antibióticos que já não podiam ser usados devido à resistência adquirida por parte das bactérias. No entanto, deve-se procurar fracionar e purificar estes extratos e confirmar novamente a sua atividade. Numa outra fase deve-se também identificar quais os compostos que têm esta atividade.

A descoberta de substâncias com efeito antagónico pode também ser uma mais-valia, em virtude dos efeitos potenciais destas substâncias sobre a transferência de resistências no meio ambiente. Sendo bem conhecido que grande parte dos determinantes genéticos de resistência se disseminam entre as diferentes estirpes microbianas a nível ambiental, sendo este processo regulado pela presença de resíduos antimicrobianos (libertados nas fezes e urina de humanos e animais em tratamento), muito haverá a estudar sobre o impacto de substâncias produzidas por cianobactérias, que possam interagir sinérgica ou antagonicamente com esses resíduos.

Em ensaios futuros será também importante determinar as condições nas quais estes compostos são produzidos, isto é, quais as condições de cultura favoráveis, como temperatura, luminosidade, nutrientes e oxigenação e também em que fase do crescimento a produção destes compostos é maior. Também a libertação destes

compostos para o meio de cultura deve ser avaliada, visto que é importante saber qual a ação real destes compostos num sistema natural.

Referências Bibliográficas

- Abed, R. M. M., Dobretsov, S., Sudesh, K., 2009. Applications of cyanobacteria in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology*, 106: 1-12.
- Allen, H. K., Donato, J., Wang, H. H., Cloud- Hansen, K. A., Davies, J., Handelsman, J., 2010. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews: Microbiology*, 8: 251- 259.
- Asthana, R. V., Srivastava, A., Singh, A. P., Deepali, Singh, S. P., 2006. Identification of an antimicrobial entity from the cyanobacterium *Fischerella* sp. isolated from bark of *Azadirachta indica* (Neem) tree. *Journal of Applied Phycology*, 18: 33- 39.
- Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C., Turck, M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 36: 493-496.
- Bloor S., England, R. R., 1989. Antibiotic production by the cyanobacterium *Nostoc muscorum*. *Journal of Applied Phycology*, 1: 367- 372.
- Bomo, A. M., Tryland, I., Haande, S., Hagman, C. H. C., Utkilen, H., 2011. The impact of cyanobacteria on growth and death of opportunistic pathogenic bacteria. *Water Science and Technology*, 64 (2): 384- 390.
- Burja, A. M., Banaigs, B., Mansour, E. A., Burgess, J. G., Wright, P. C., 2001. Marine cyanobacteria- a prolific source of natural products. *Tetrahedron*, 57: 9347- 9377.
- Cannell, R. J. P., Owsianka, A. M., Walker, J. M., 1988. Results of a Large- Scale Screening Programme to Detect Antibacterial Activity from freshwater Algae. *British Phycological Journal*, 23:1, 41- 44.
- Carmichael, W. W., 1992. Cyanobacteria secondary metabolites- the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology*, 72: 445- 459.
- Codd, G. A., Lindsay, J., Young, F. M., Morrison, L. F., Metcalf, J. S., 2005. Harmful Cyanobacteria, from mass mortalities to management measures. *Harmful Cyanobacteria* 1- 23.

Cos, P., Vlietinck, A. J., Berghe, D. V., Maes, L., 2006. Anti-infective potencial of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *Journal of Ethnopharmacology*, 106: 290- 302.

Costa, P. M., Pires, P. V., Bernardo, F., 2006. Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. Isolated in inflow, efluente and sludge from municipal sewage water treatment plants. *Water Research*, 40: 1735- 1740.

Costa, P. M., Oliveira, M., Bica, A., Pires, P. V., Bernardo, F., 2007. Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* isolated from poultry feed and feed ingredients. *Veterinary Microbiology*, 120: 122- 131.

Dancer, S. J. 2004. How antibiotics can make us sick: the less obvious adverse effects of antimicrobial chemotherapy. *The Lancet Infectious Diseases*, 4: 611- 619.

Dahms, H. U., Ying, X., Pfeiffer, C., 2006. Antifouling potencial of cyanobacteria: a mini-review. *Biofouling*, 22 (5): 317- 327.

Davies, J., Davies, D., 2010. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74 (3): 417- 433.

Fish, S. A., Codd, G. A., 1994. Analysis of culture conditions controlling the yield of bioactive material produced by the thermotolerant cyanobacterium (blue- green alga) *Phormidium*. *European Journal of Phycology*, 29:4, 261-266.

Fish, S. A., Codd, G. A., 1994. Bioactive compound production by thermophilic and thermotolerant cyanobacteria (blue-green algae). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 10: 338- 341.

Freitas, E., Aires, A., Rosa, E. A. S., Saavedra, M. J., 2013. Antibacterial activity and synergistic effect between watercress extratcts, 2-phenylethyl isothiocyanate and antibiotics against 11 isolates of *Escherichia coli* from clinical and animal source. *Letters in Applied Microbiology*, doi:10.1111/lam.12105.

Harvey, A. L., 2008. Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 13: 19- 20.

Issa, A. A., 1999. Antibiotic production by the cyanobacteria *Oscillatoria angustissima* and *Calothrix parietina*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 8: 33- 37.

Jaki, B., Orjala, J., Sticher, O., 1999. A Novel Extracellular Diterpenoid with Antibacterial Activity from the Cyanobacterium *Nostoc commune*. *Journal of Natural Products*, 62: 502- 503.

Jochimsen, E. L., Carmichael, W. W., An, J. S., Cardo, D. M., Cookson, S. T., Holmes, C. E. M., Antunes, M. B. C., Melo Filho, D. A., Lyra, T. M., Barreto, V. S. T., Azevedo, S. M. F. O., Jarvis, W. R., 1998. Liver failure and death after exposure to Microcystins at a Hemodialysis Center in Brazil. *The New England Journal of Medicine* 338 (13), 873-878.

Kellam, S. J., Walker, J. M., 1989. Antibacterial Activity from Marine Microalgae in Laboratory Culture. *British Phycological Journal*, 24: 191- 194.

Komárek, J., 2005. The Modern Classification of Cyanoprokaryotes (Cyanobacteria). *Oceanological and Hydrobiological Studies*, 34 (3): 05-17.

Komárek, J., 2010. Recent changes (2008) in cyanobacteria taxonomy based on a combination of molecular background with phenotype and ecological consequences (genus and species concept). *Hydrobiologia*, 639: 245- 259.

Komárek, J., 2011. Introduction to the 18th IAC Symposium in Ceske Budejovice 2010, Czech Republic; Some current problems of modern cyanobacterial taxonomy. *Fottea* 11 (1): 1-7.

Kreitlow, S., Mundt, S., Lindequist, U., 1999. Cyanobacteria- a potencial source of new biologically active substances. *Journal of Biotechnology*, 70: 61- 63.

Leão, P. N., Vasconcelos, M. T. S. D., Vasconcelos, V. M., 2009. Allelopathic activity of cyanobacteria on green microalgae at low cell densities. *European Journal of Phycology*, 44 (3): 347- 355.

Leão, P. N., Pereira, A. R., Liu, W. T., Ng, J., Pevzner, P. A., Dorrestein, P. C., König, G. M., Vasconcelos, V. M., Gerwick, W. H., 2010. Synergistic allelochemicals from a freshwater cyanobacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107 (25): 11183- 11188.

Leão, P. N., Ramos, V., Vale, M., Machado, J. P., Vasconcelos, V. M., 2012. Microbial Community Changes Elicited by Exposure to Cyanobacterial Allelochemicals. *Microbial Ecology*, 63: 85- 95.

Lips, I., Lips, U., 2008. Abiotic factors influencing cyanobacterial bloom development in the Gulf of Finland (Baltic Sea). *Hydrobiologia*, 614: 133- 140.

Lopes, V., Schmidtke, M., Fernandes, M. H., Martins, R., Vasconcelos, V., 2011. Cytotoxicity in L929 fibroblasts and inhibition of herpes simplex vírus type 1 Kuoka by estuarine cyanobacteria extracts. *Toxicology in Vitro*, 25: 944- 950.

Manaia, C. M., Moreira, I. V., Nunes, O. C., 2011. Antibiotic Resistance in Waste Water and Surface Water and Human Health Implications. *Emerging Organic Contaminants and Human Health*. doi 10.1007/698_2011_118.

Martins, J., Peixe, L., Vasconcelos, V. M., 2011. Unraveling Cyanobacteria Ecology in Wastewater Treatment Plants (WWTP). *Microbial Ecology*, 62: 241- 256.

Martins, R. F., Ramos, M. F., Herfindal, L., Sousa, J. A., Skaerven, K., Vasconcelos, V. M., 2008. Antimicrobial and Citotoxic Assessment of marine Cyanobacteria- *Synechocystis* and *Synechococcus*. *Marine Drugs*, 6 (1): 1- 11.

Mendes, M., 2012. Resistência a antibióticos em bactérias isoladas de animais selvagens de regiões remotas. Tese de Mestrado. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

Mundt, S., Kreitlow, S., Nowotny, A., Effmert, U., 2001. Biochemical and pharmacological investigations of selected cyanobacteria. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 203: 327- 334.

Neilan, B. A., Pearson, L. A., Muenchhoff, J., Moffitt, M. C., Dittmann, E., 2012. Environmental conditions that influence toxin biosynthesis in cyanobacteria. *Environmental Microbiology*, doi:10.1111/j.1462-2920.2012.02729.x

Nostro, A., Germanò, M. P., D'Angelo, V., Marino, A., Cannatelli, M. A., 2000. Extration methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Letters in Applied Microbiology*, 30: 379- 384.

Ostensvik, O., Skulberg, O. M., Underdal, B., Hormazabal, V., 1998. Antibacterial properties of extracts from selected planktonic freshwater cyanobacteria- a comparative study of bacterial bioassays. *Journal of Applied Microbiology*, 84: 1117- 1124.

Paerl, H. W., Fulton, R. S., Moisaner, P. H., 2001. Harmful Freshwater Algal Blooms, With an Emphasis on Cyanobacteria. *The Scientific World*, 1: 76- 113.

Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M., Stanier, R. Y., 1979. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, 111: 1- 61.

Semary, N. A. E., 2012. The antimicrobial profile of extracts of a Phormidium- like cyanobacterium changes with phosphate levels. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28: 585-593.

Semary, N. A. E., Naby, M. A. E., 2010. Characterization of a *Synechocystis* sp. from Egypt with the potencial of bioactive compounds production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26: 1125- 1133.

Sharma, N. K., Tiwari, S. P., Tripathi, K., Rai, A. K., 2010. Sustainability and cyanobacteria (blue- green algae): facts and challenges. *Journal of Applied Phycology*. doi: 10.1007/s10811-010-9626-3

Smânia Jr., A.,Valgas, C., Souza, S. M., Smânia, E. F. A., 2007. Screening Methods to Determinate Antibacterial Activity of Natural Products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38: 369- 380.

Teuber, M., 2001. Veterinary use and antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology*, 4: 493- 499.

Valdor, R., Aboal, M., 2007. Effects of living cyanobacteria, cyanobacterial extracts and pure microcystins on groth and ultrastructure of microalgae and bacteria. *Toxicon*, 49: 769-779.

Volk, R. B., Furkert, F. H., 2006. Antialgal, antibacterial and antifungal activity of two metabolites produced and excreted by cyanobacteria during growth. *Microbial Research*, 161: 180- 186.

Waterbury, J. B., 2006. The Cyanobacteria – Isolation, Purification and Identification. *Prokaryotes*, 4: 1053- 1073.

Anexos

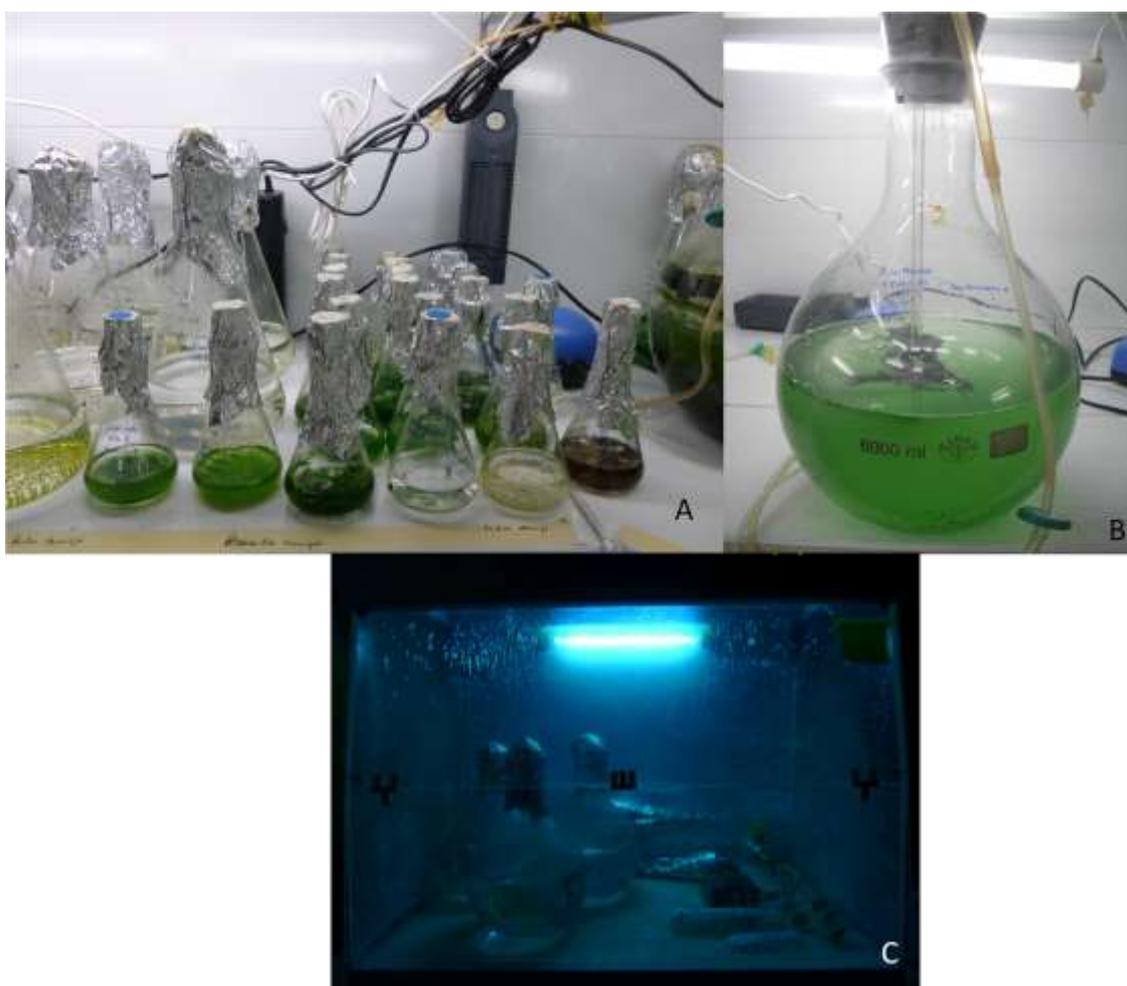
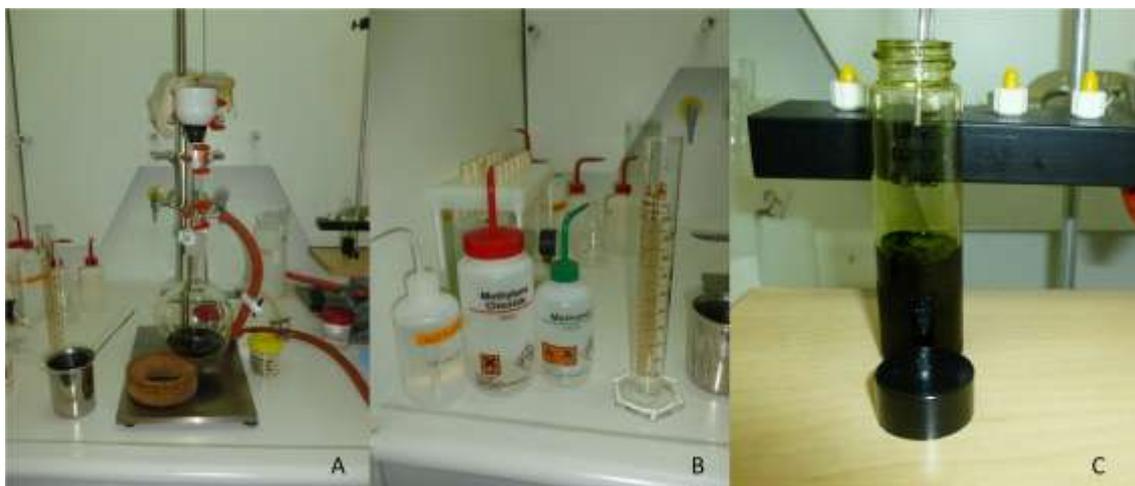


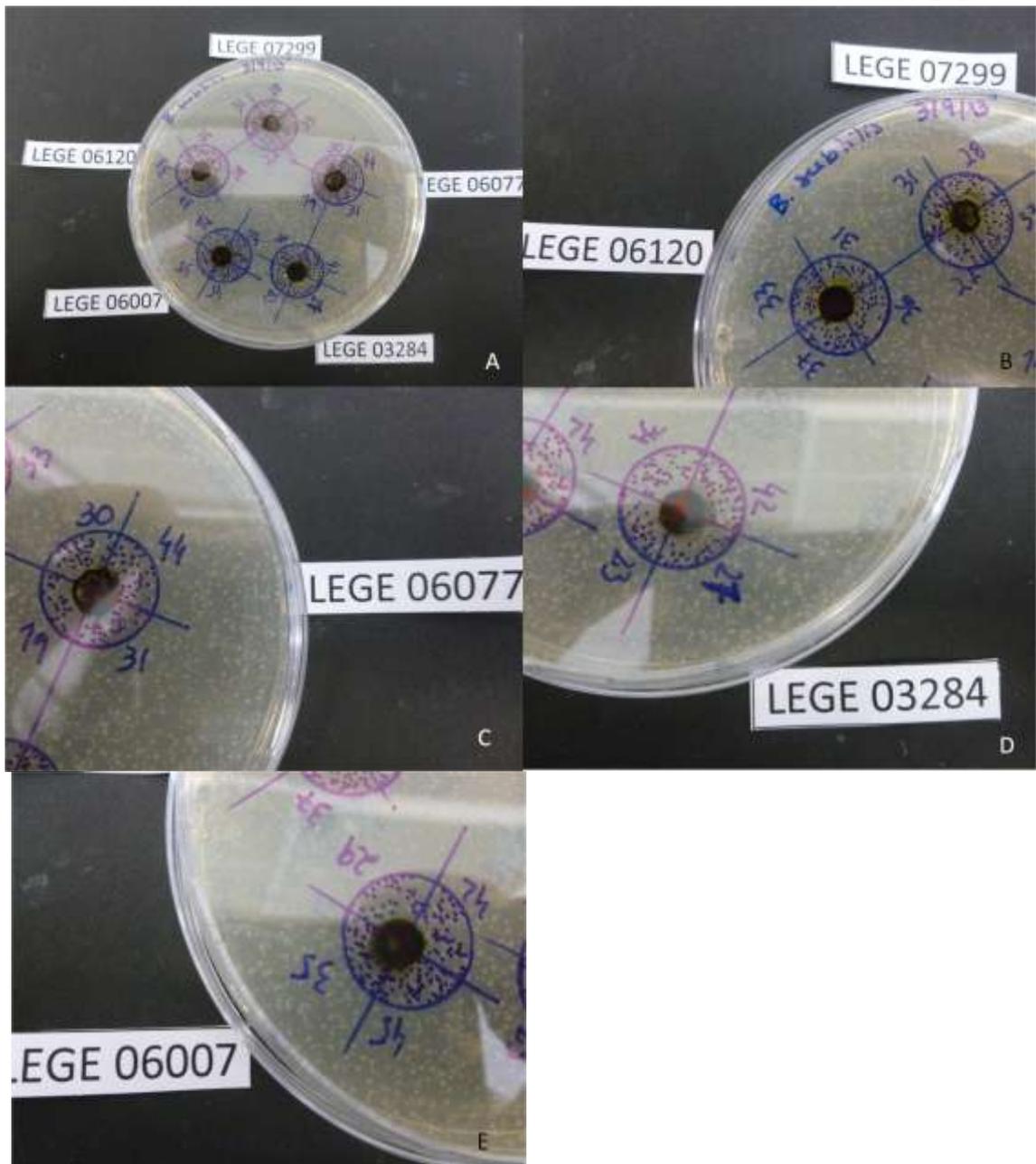
Figura 6.1: A- Stock de cianobactérias em matrizes de 100 mL e 1L; B- Crescimento em balão de 6 L e arejamento; C- Esterilização do material de vidro e descartável na câmara de fluxo com radiação Ultra-violeta

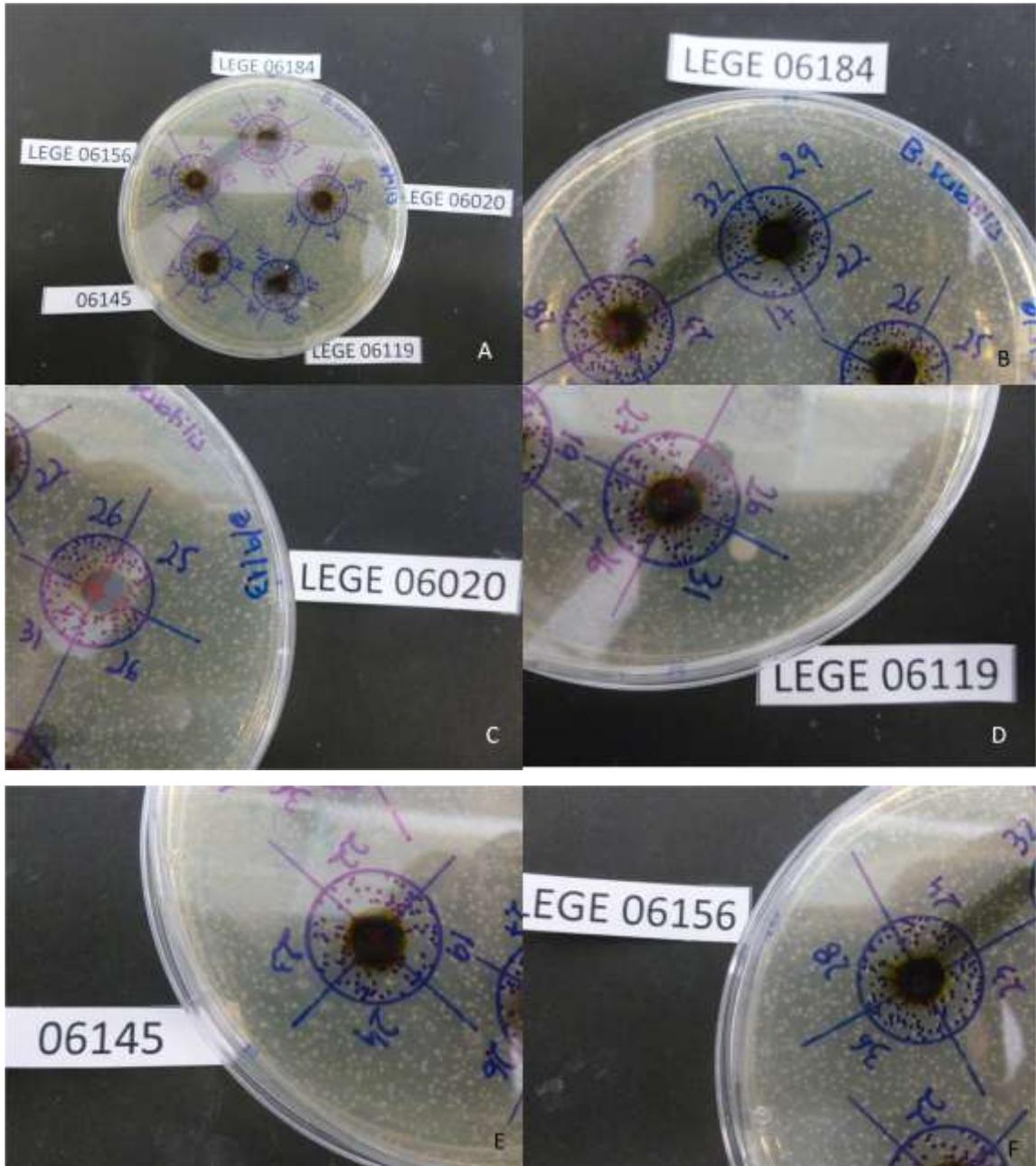


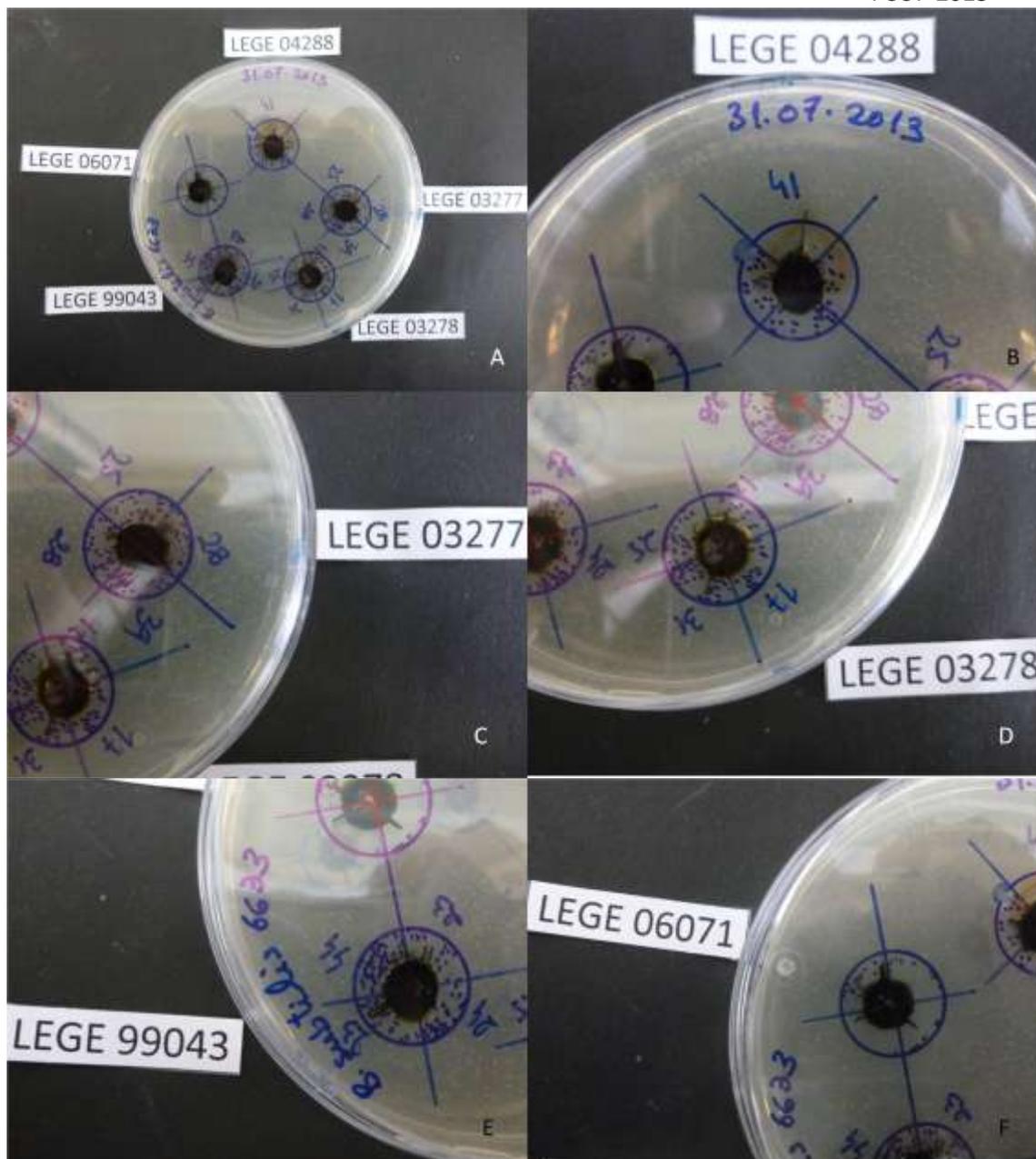
Figura 6.2: A- Recolha de cianobactérias usando rede de plâncton; B- Recolha de cianobactérias por centrifugação

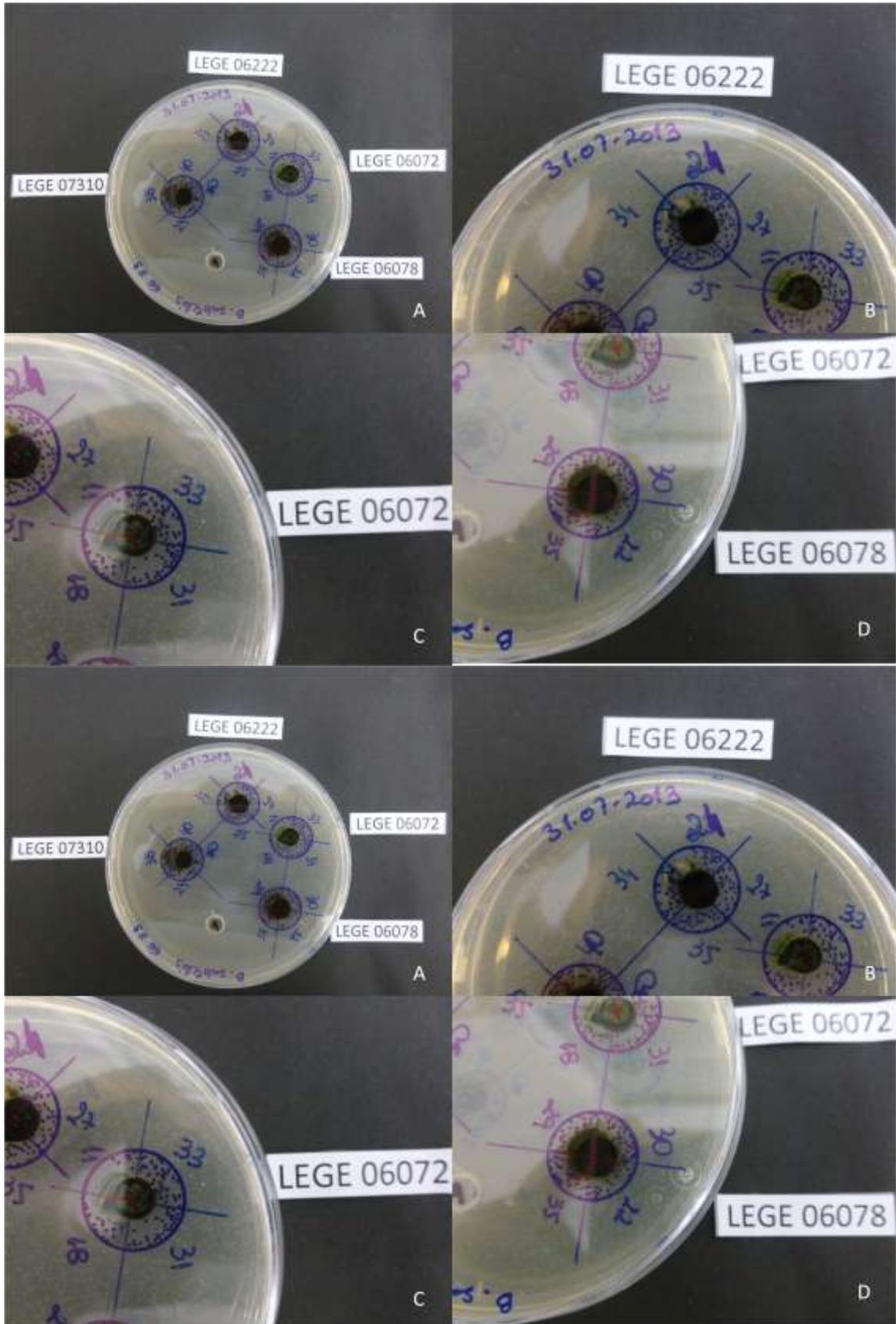


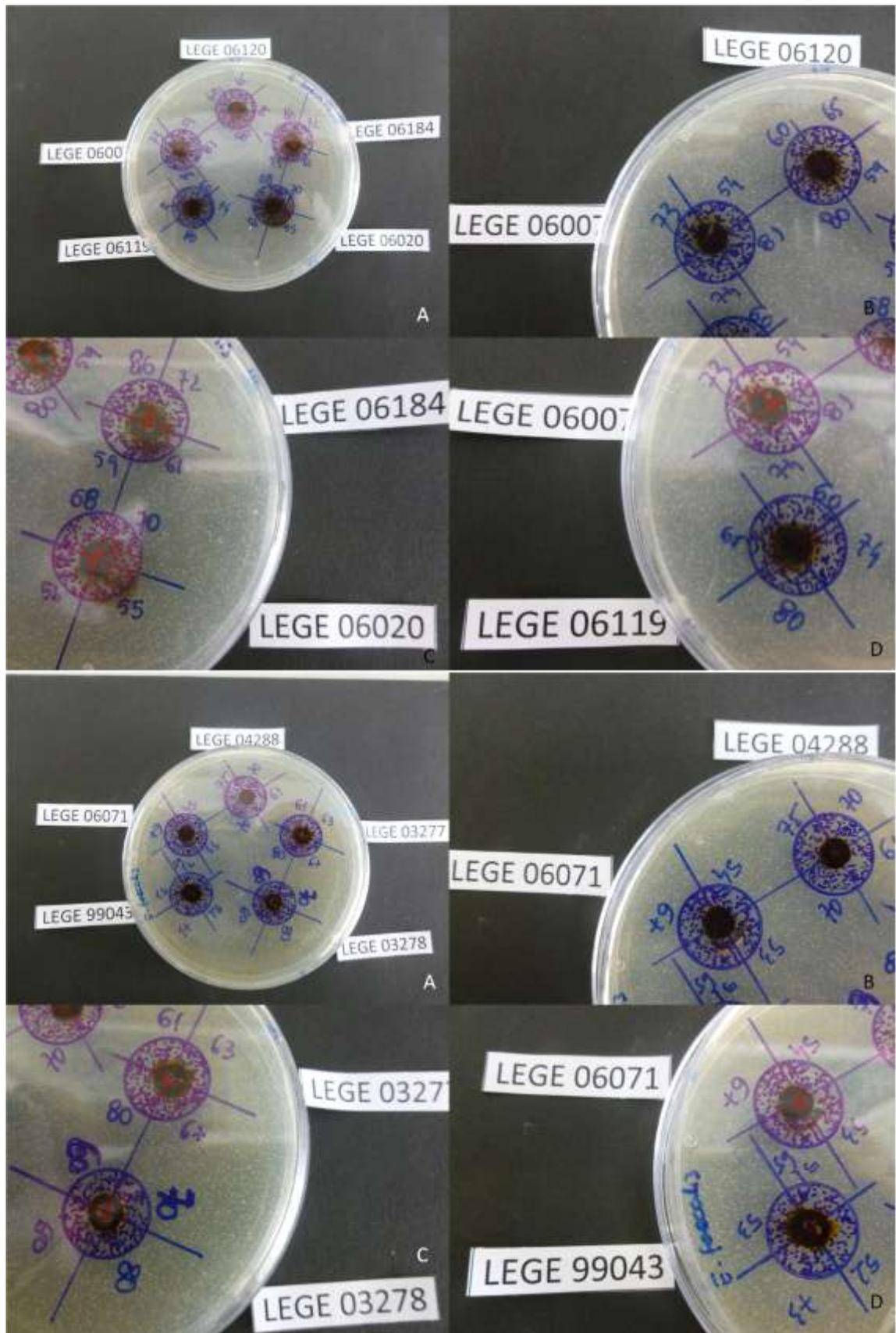
6.3: A- Montagem do material para extração; B- Reagentes usados (Diclorometano e Metanol); C- Secagem do extrato em azoto gasoso











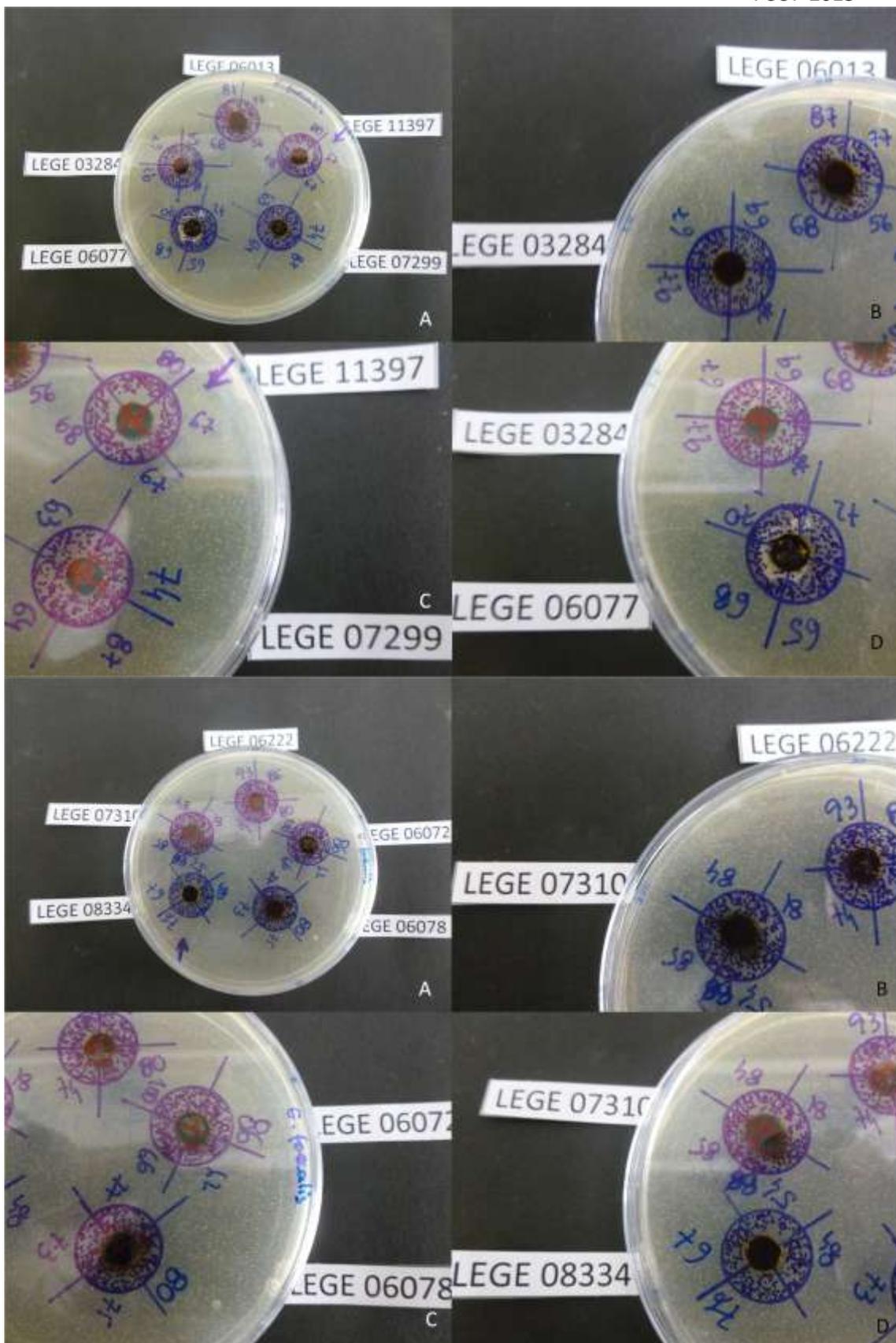
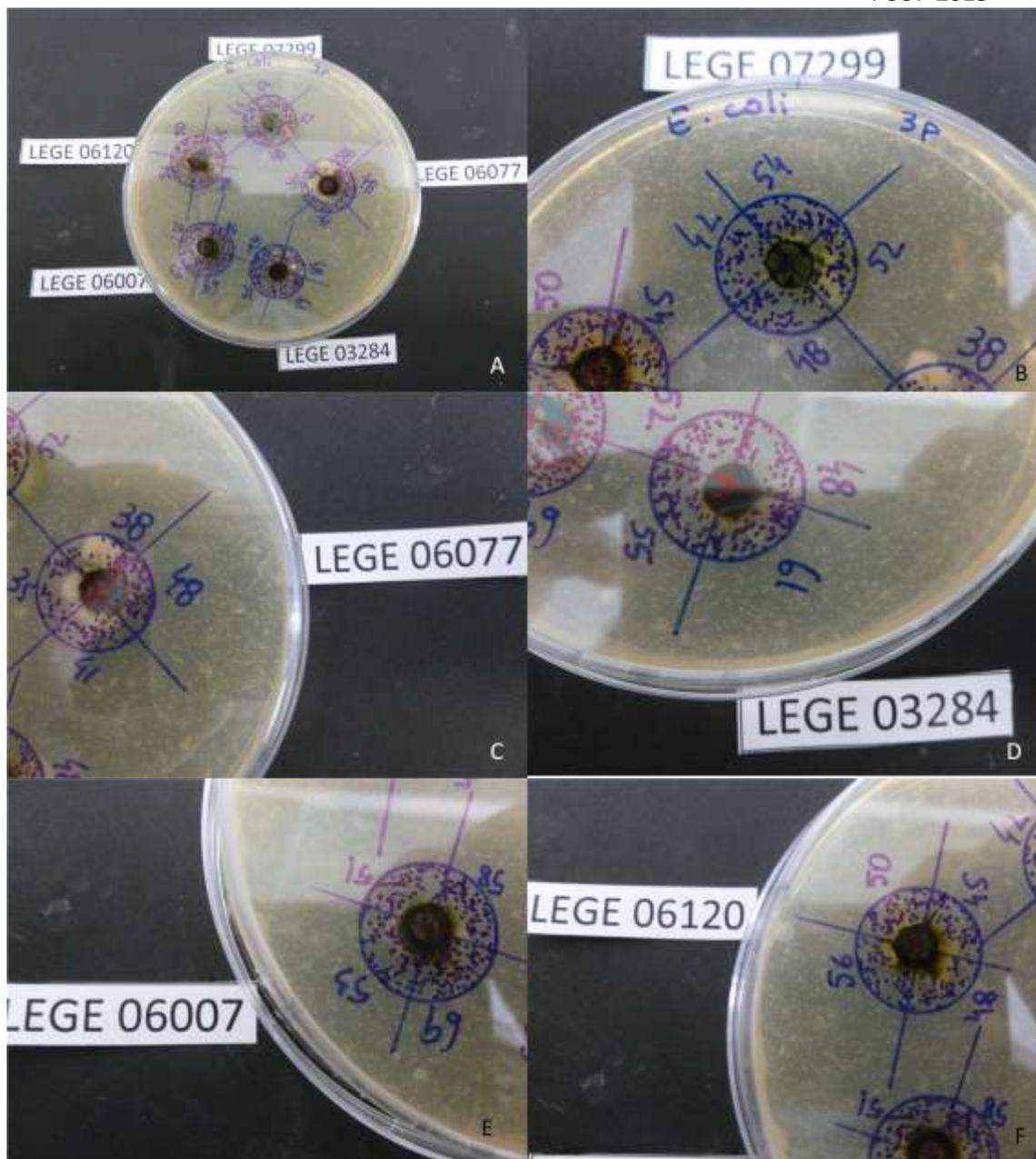
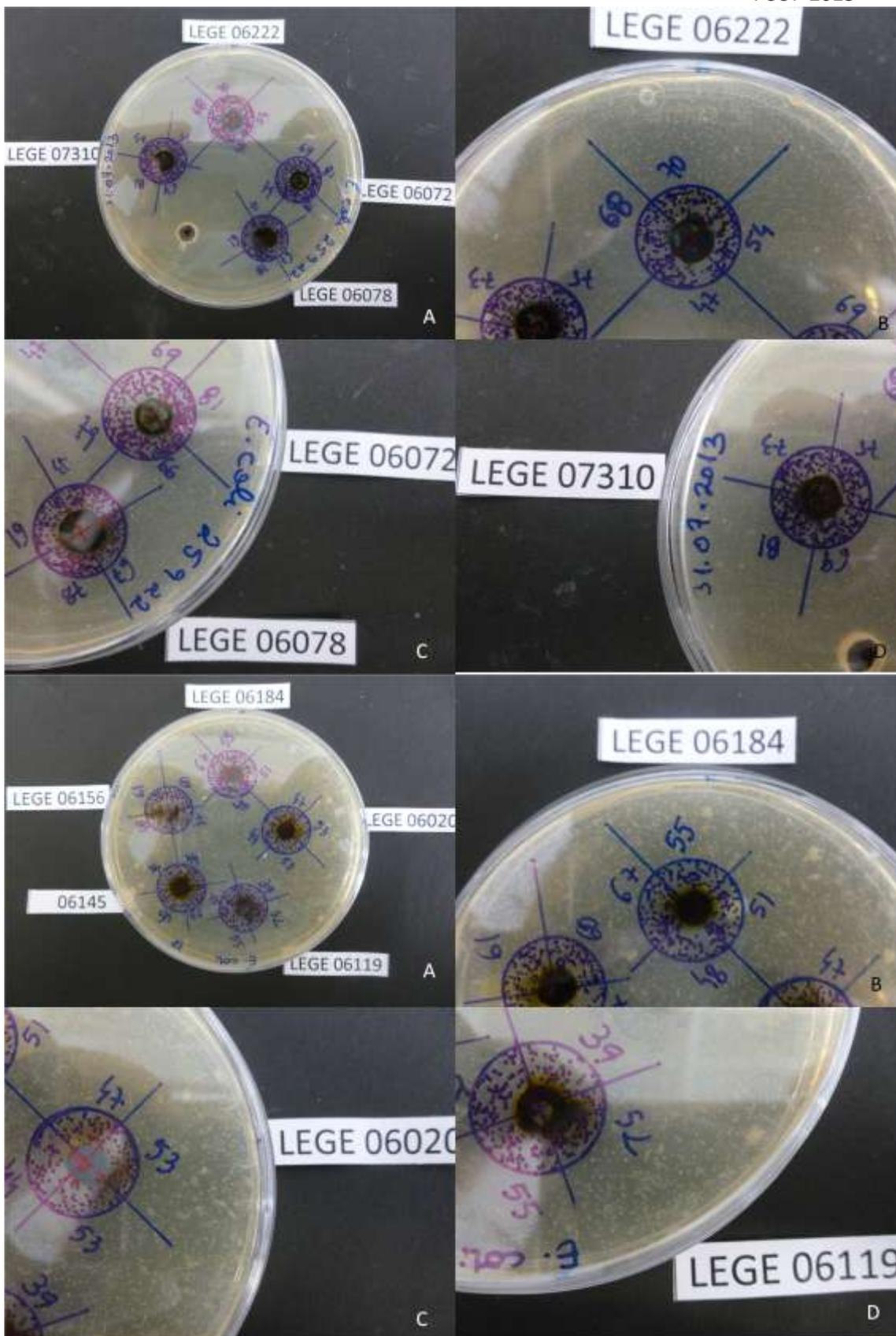
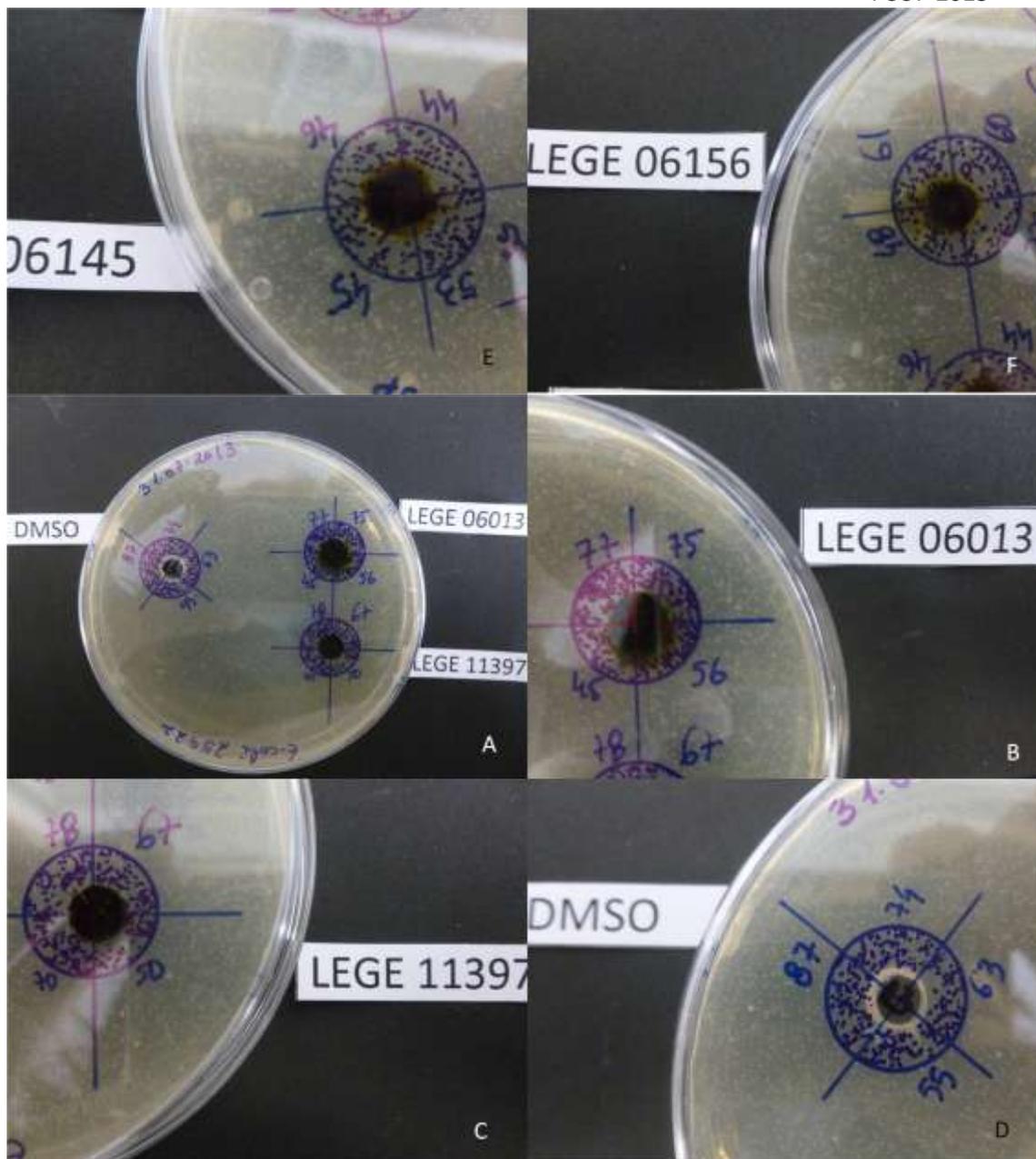
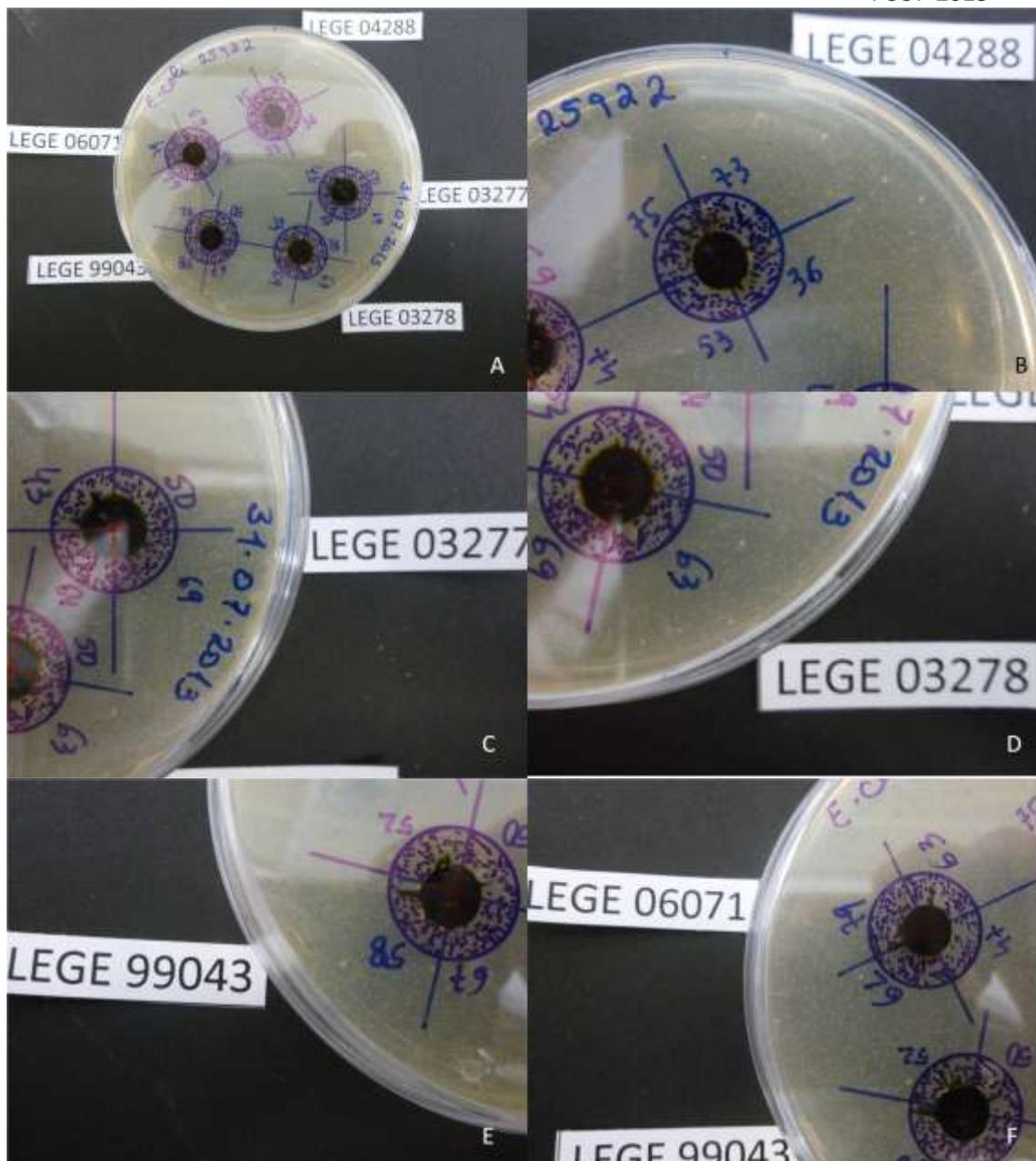


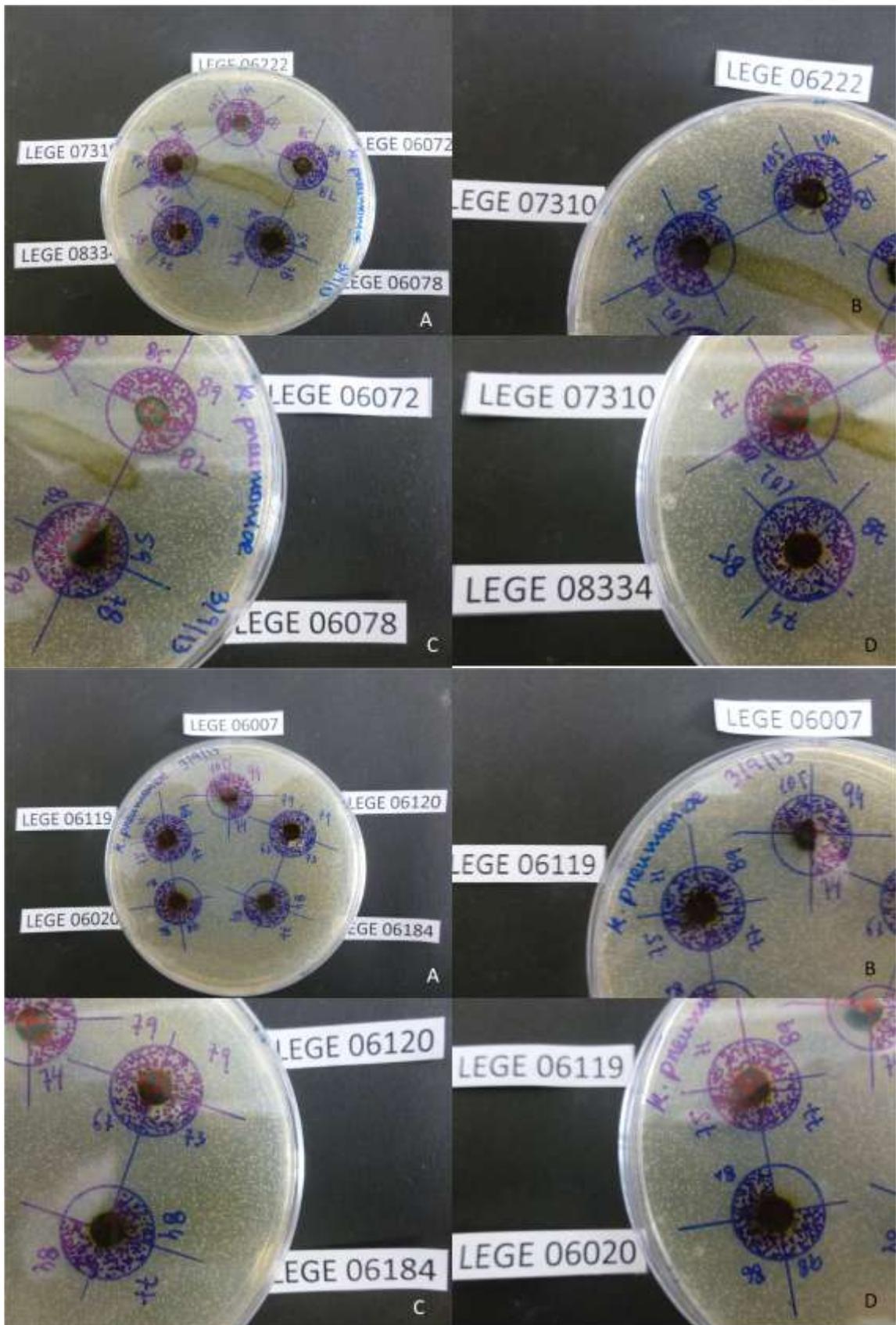
Figura 6.5: Antibiogramas para *E. faecalis*

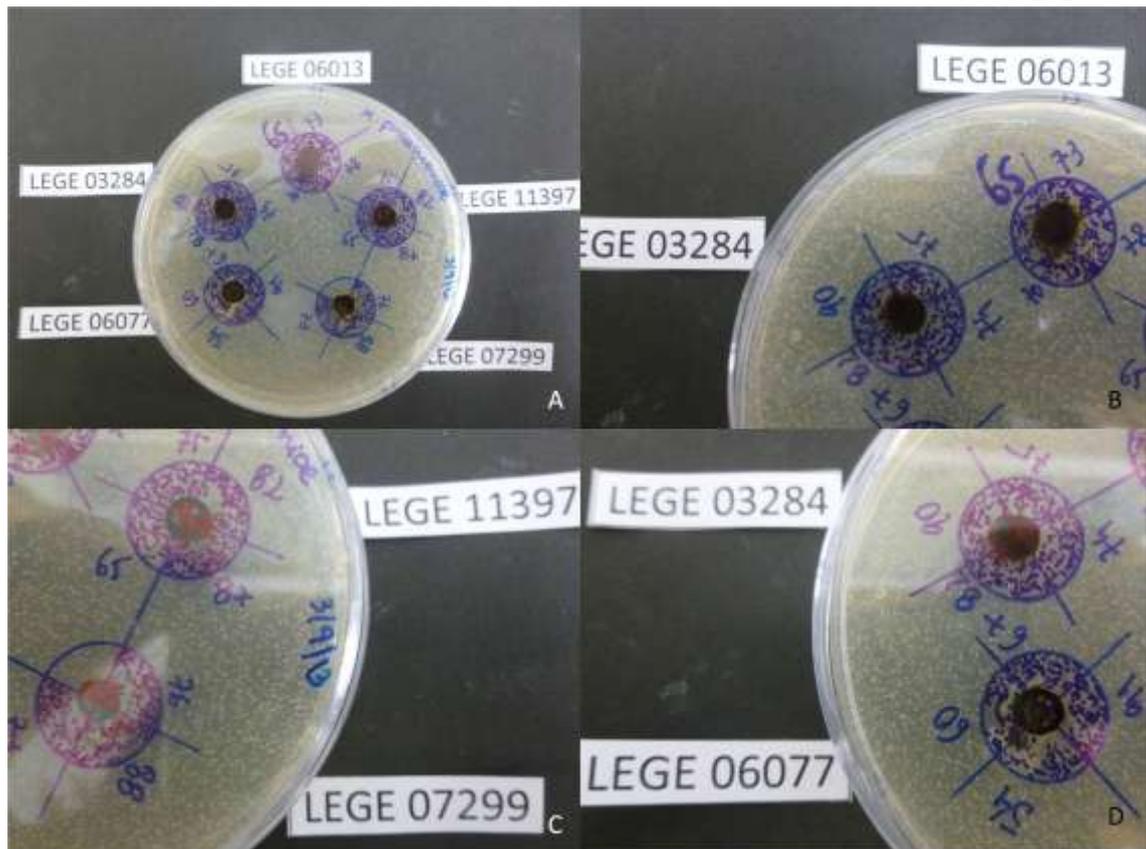


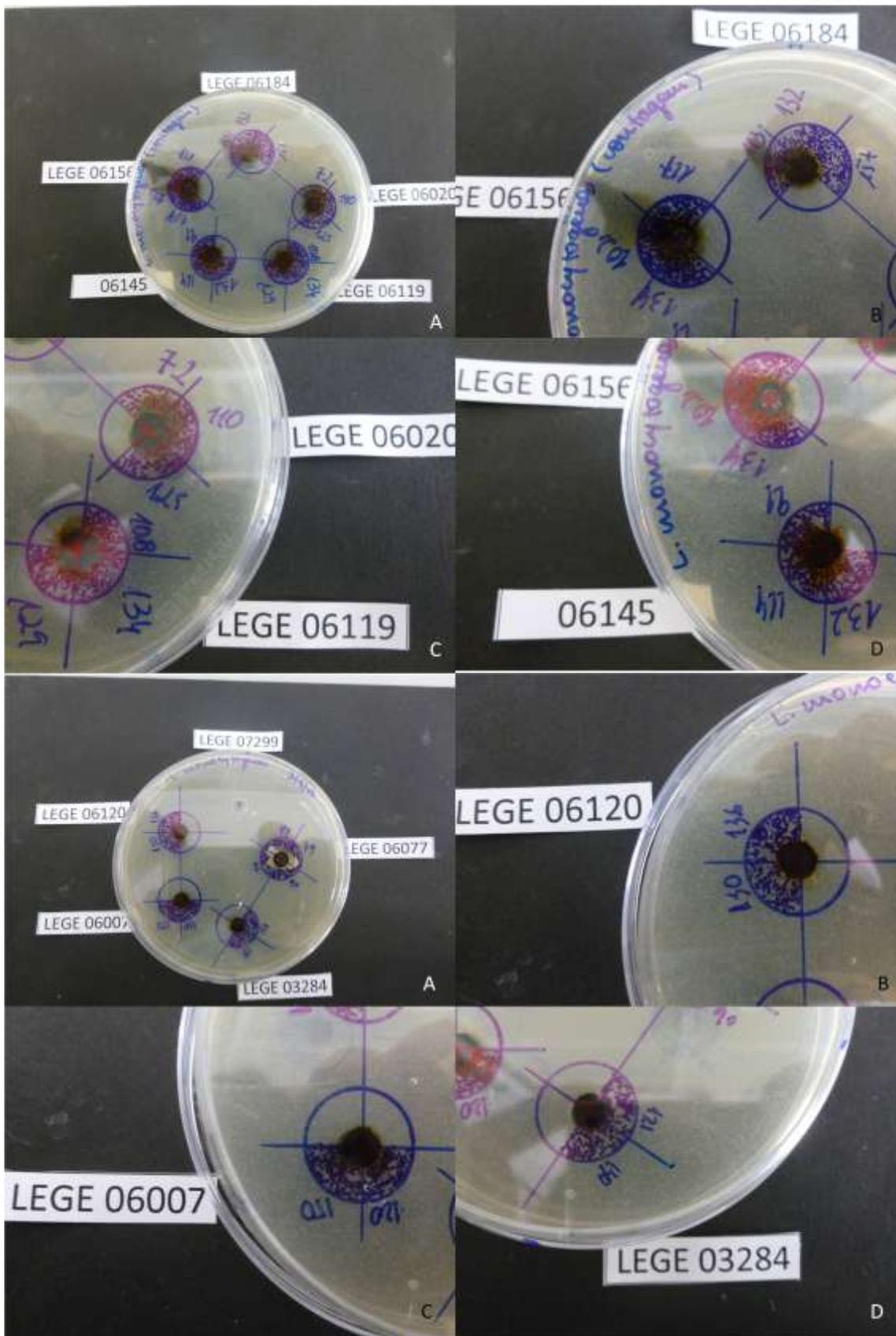


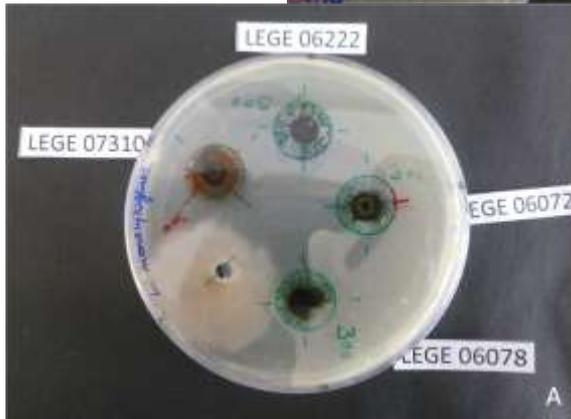
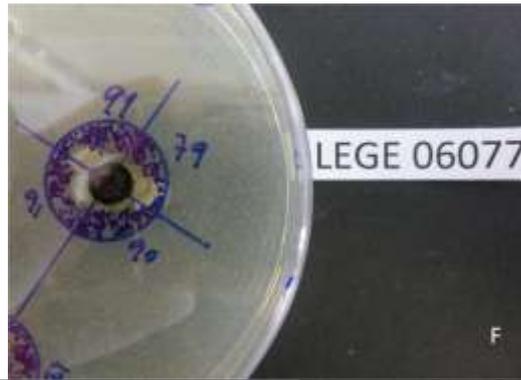


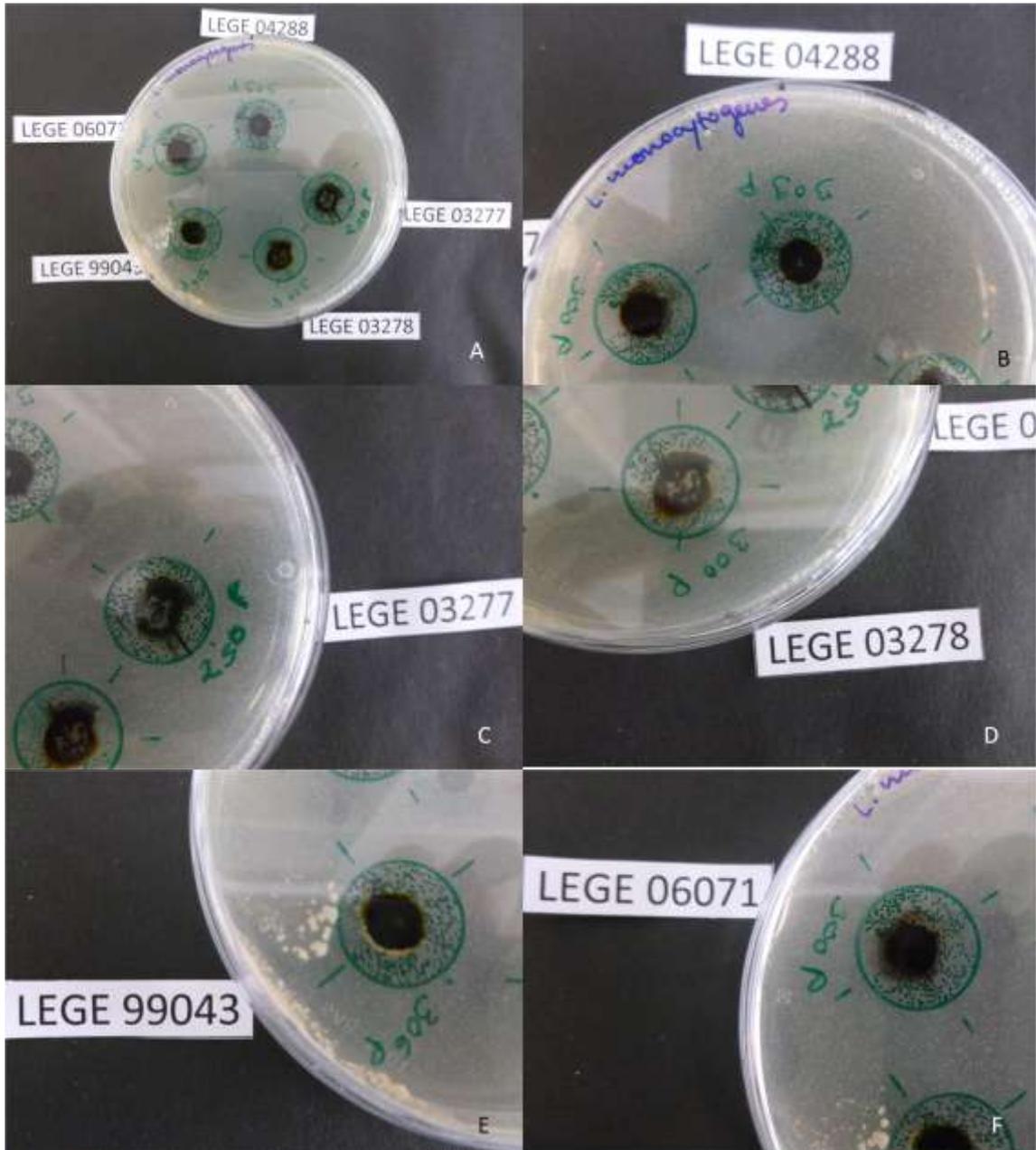
Figura 6.6: Antibiógramas para *E. coli*



Figura 6.7: Antibiogramas para *K. pneumoniae*







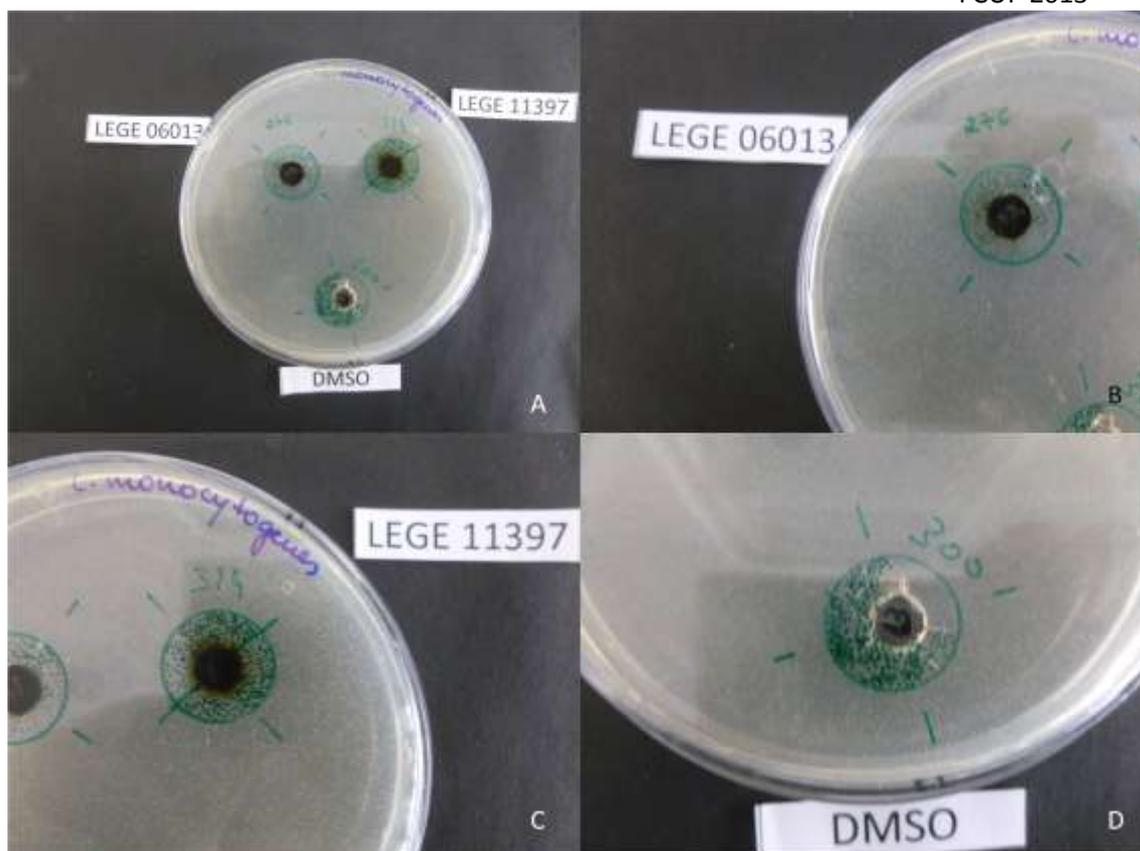
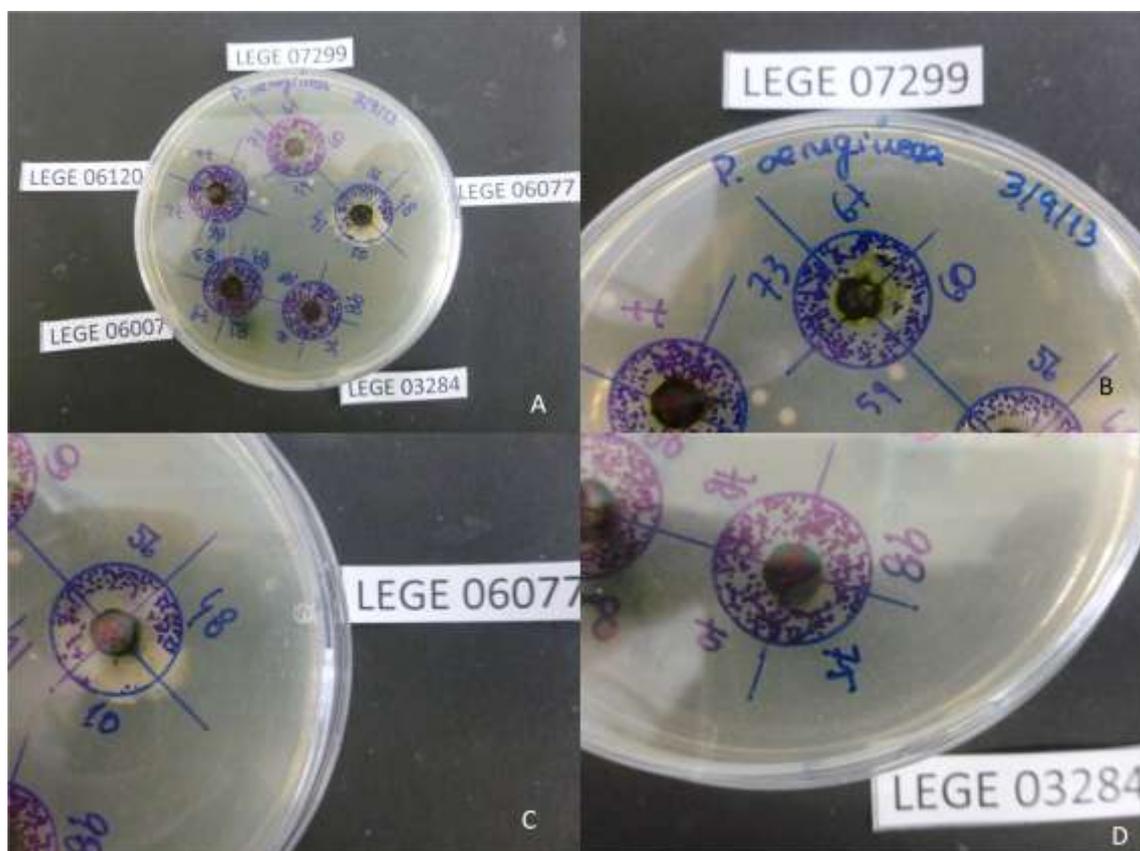
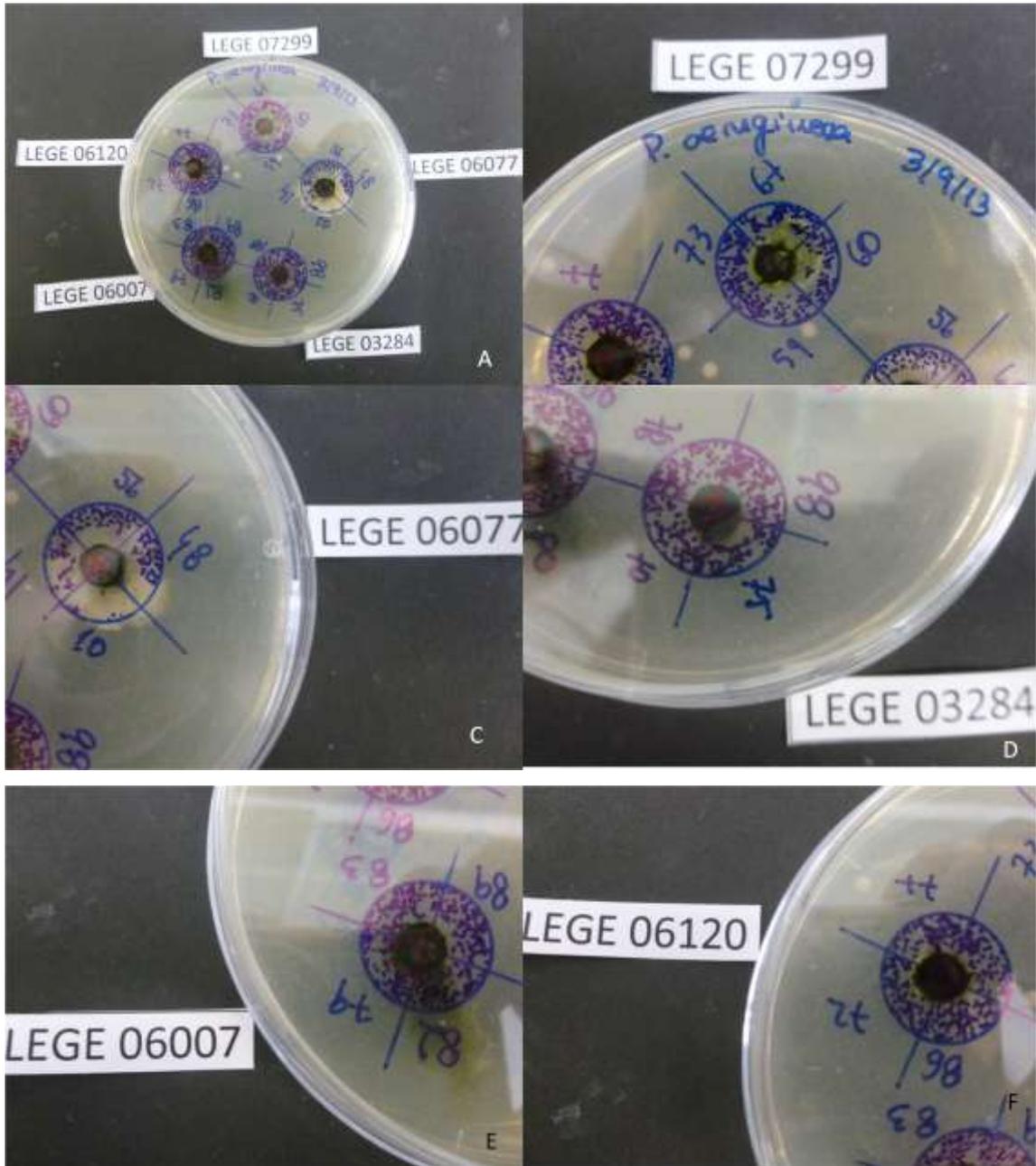
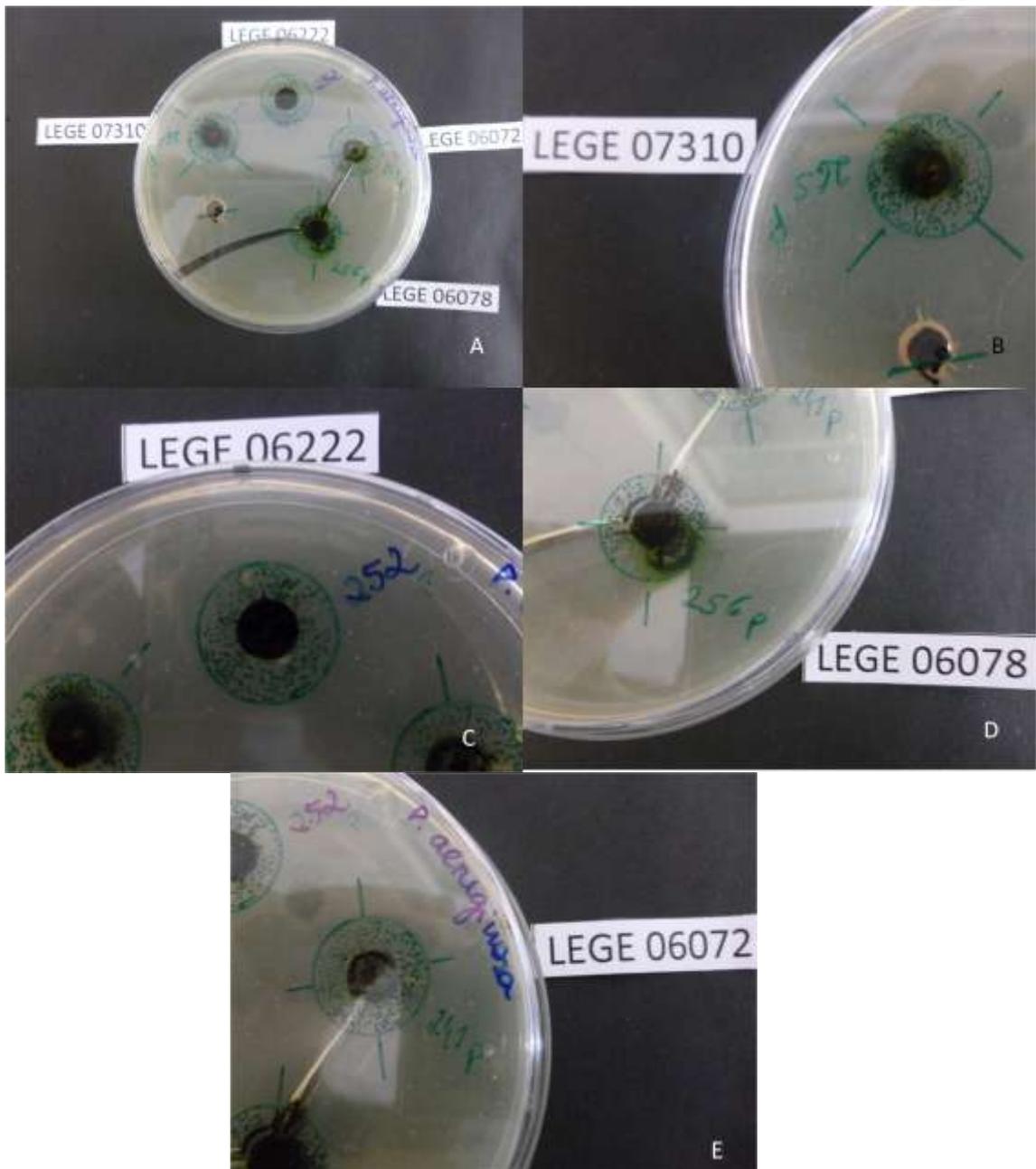
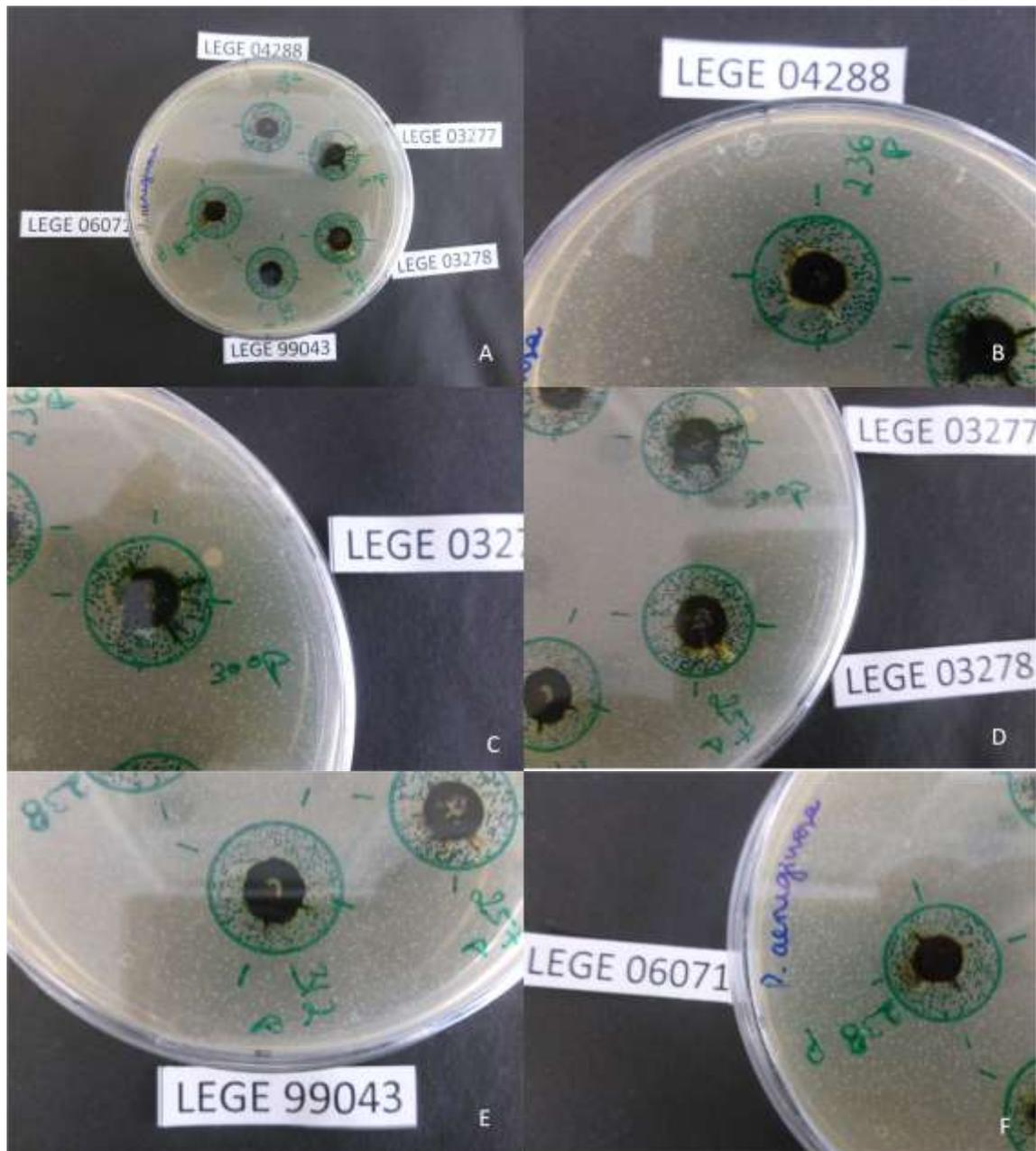


Figura 6.8: Antibiogramas para *L. monocytogenes*









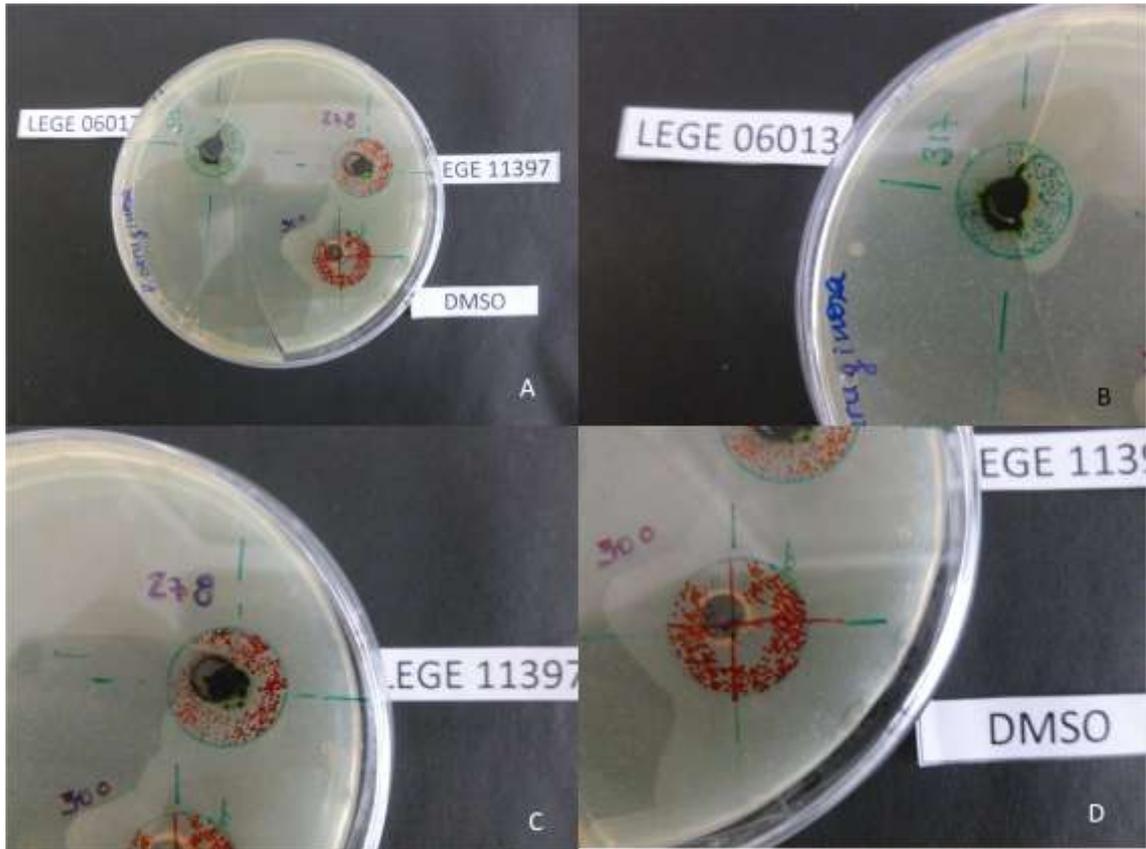
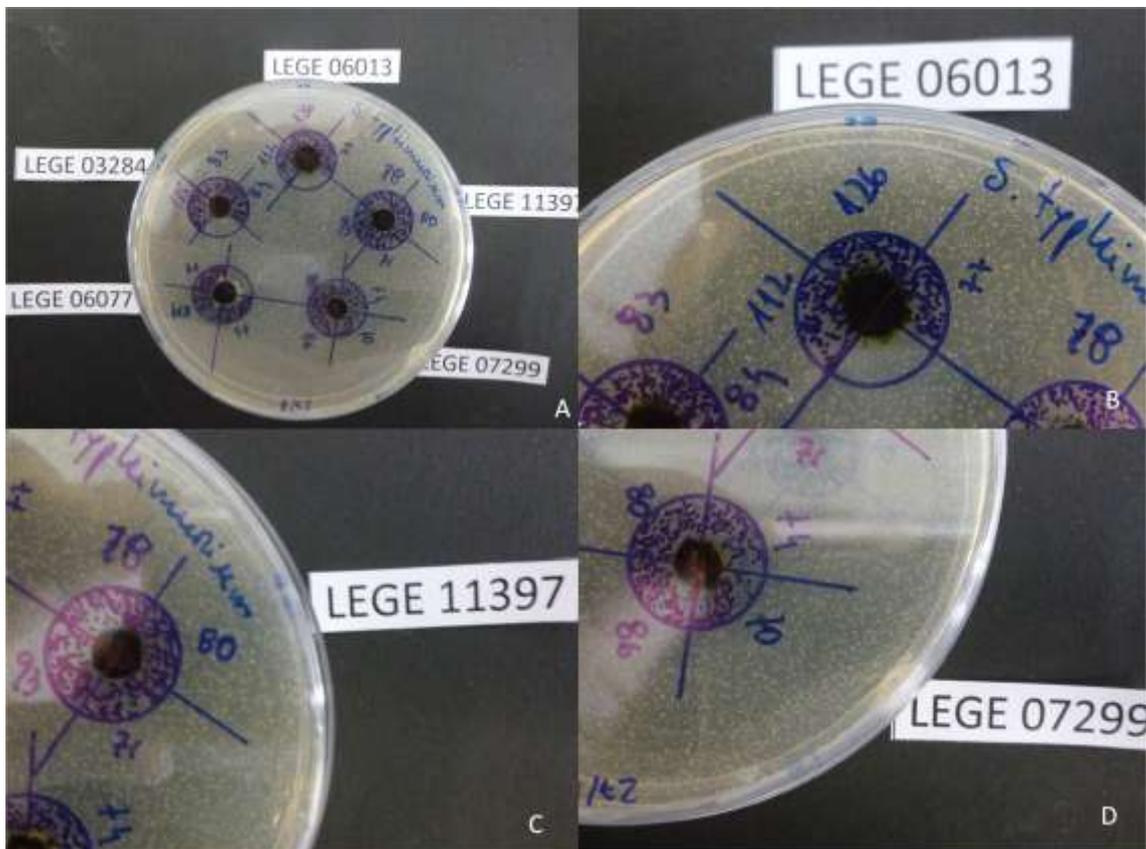
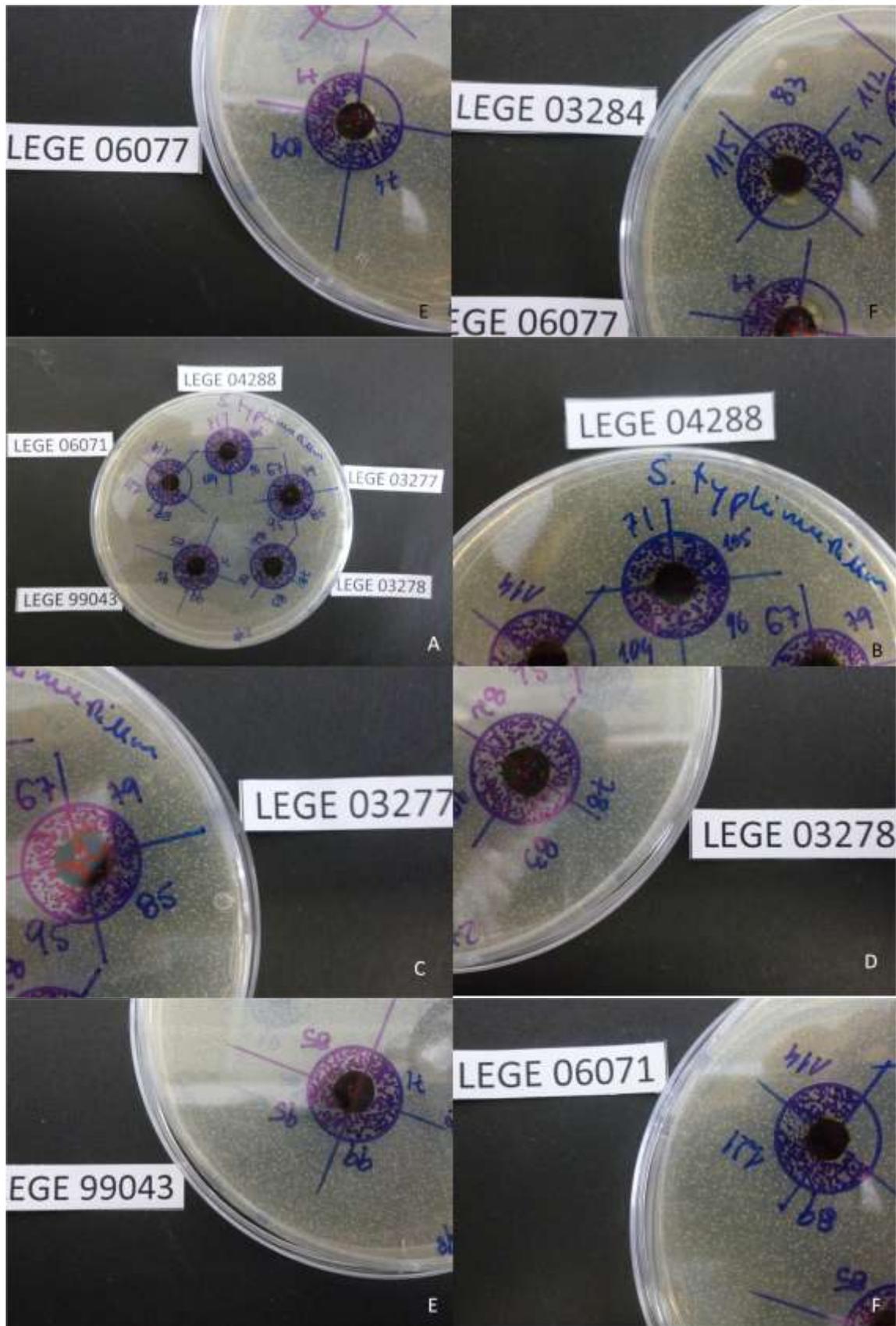


Figura 6.9: Antibiogramas para *P. aeruginosa*





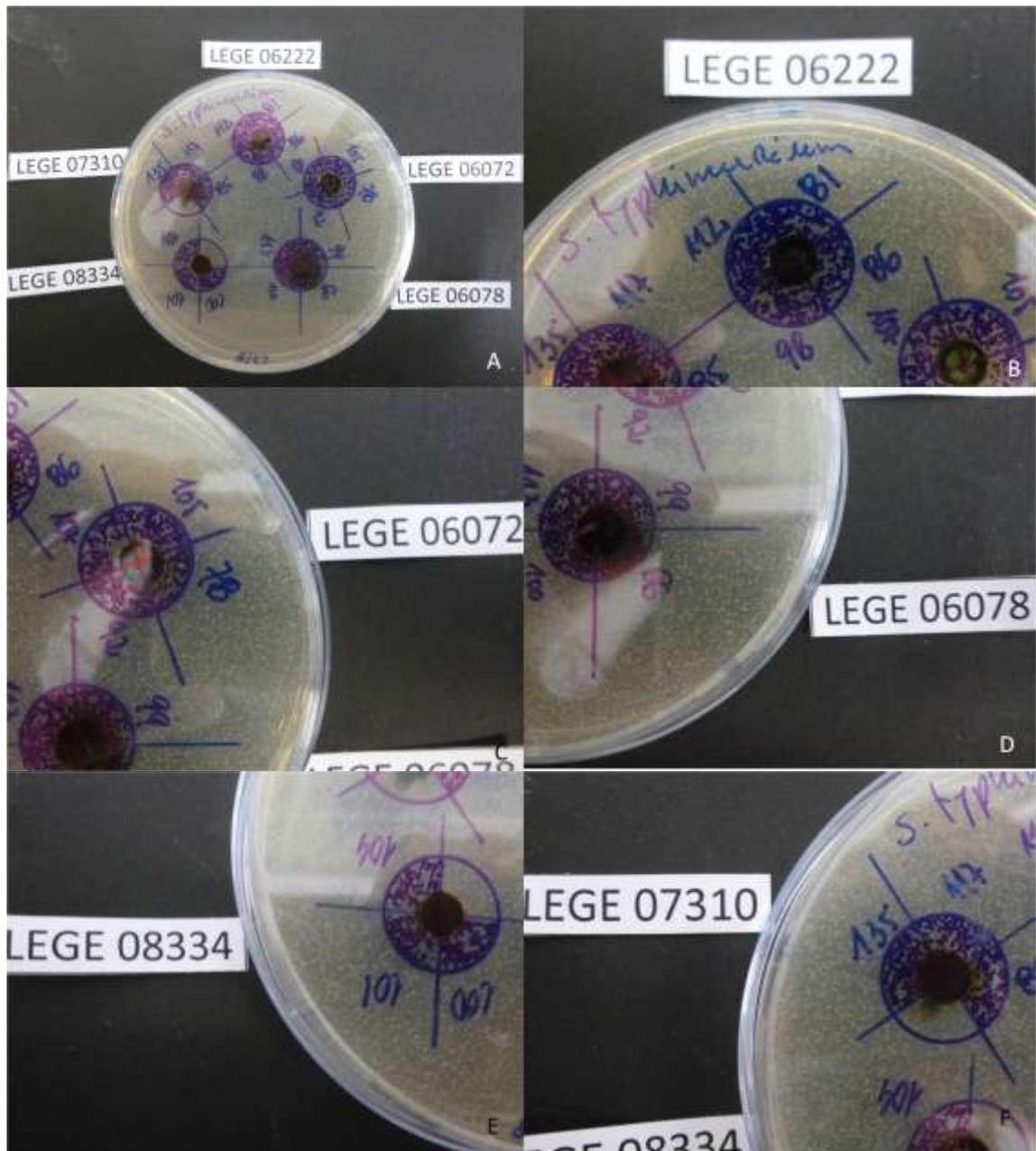
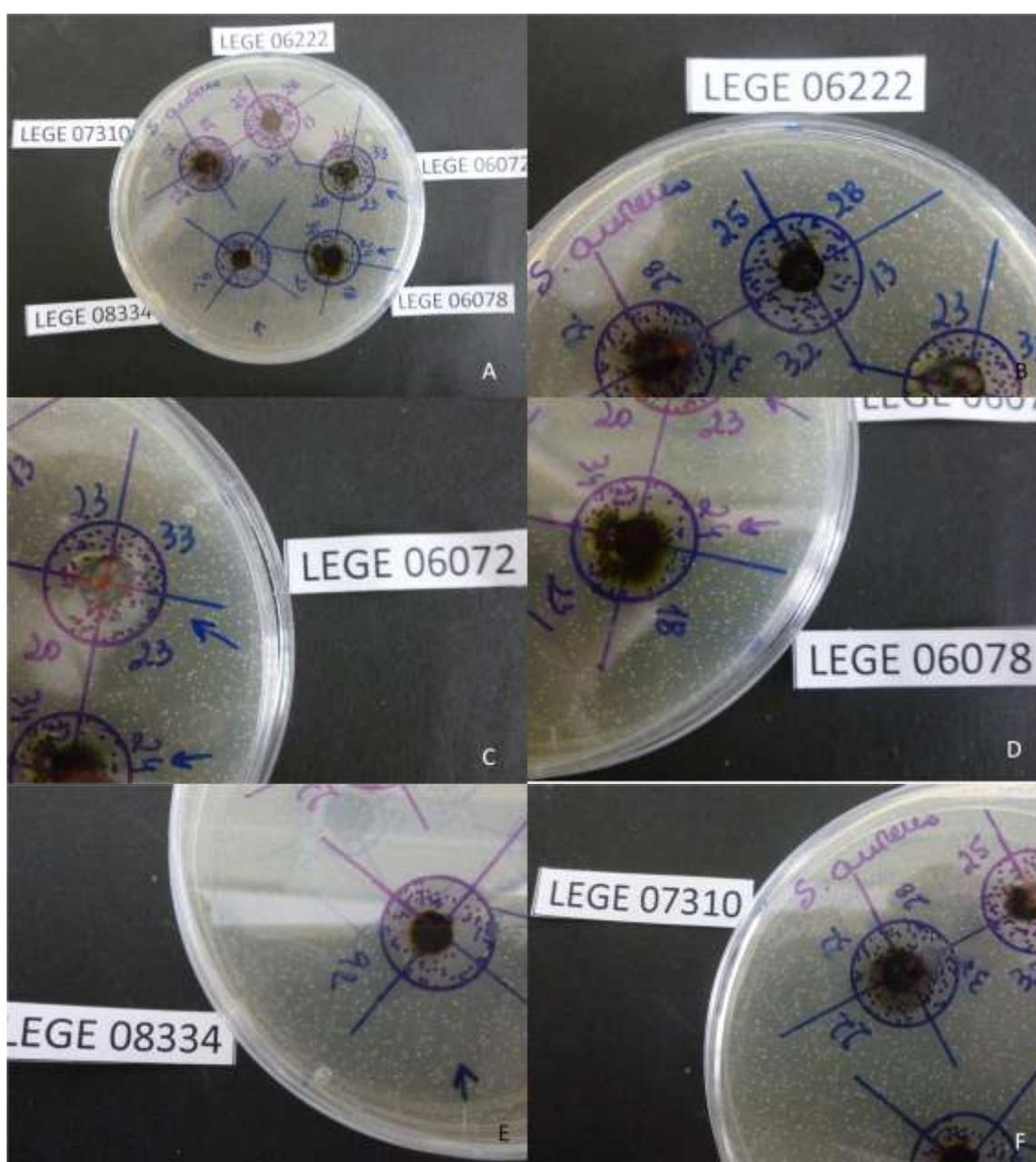
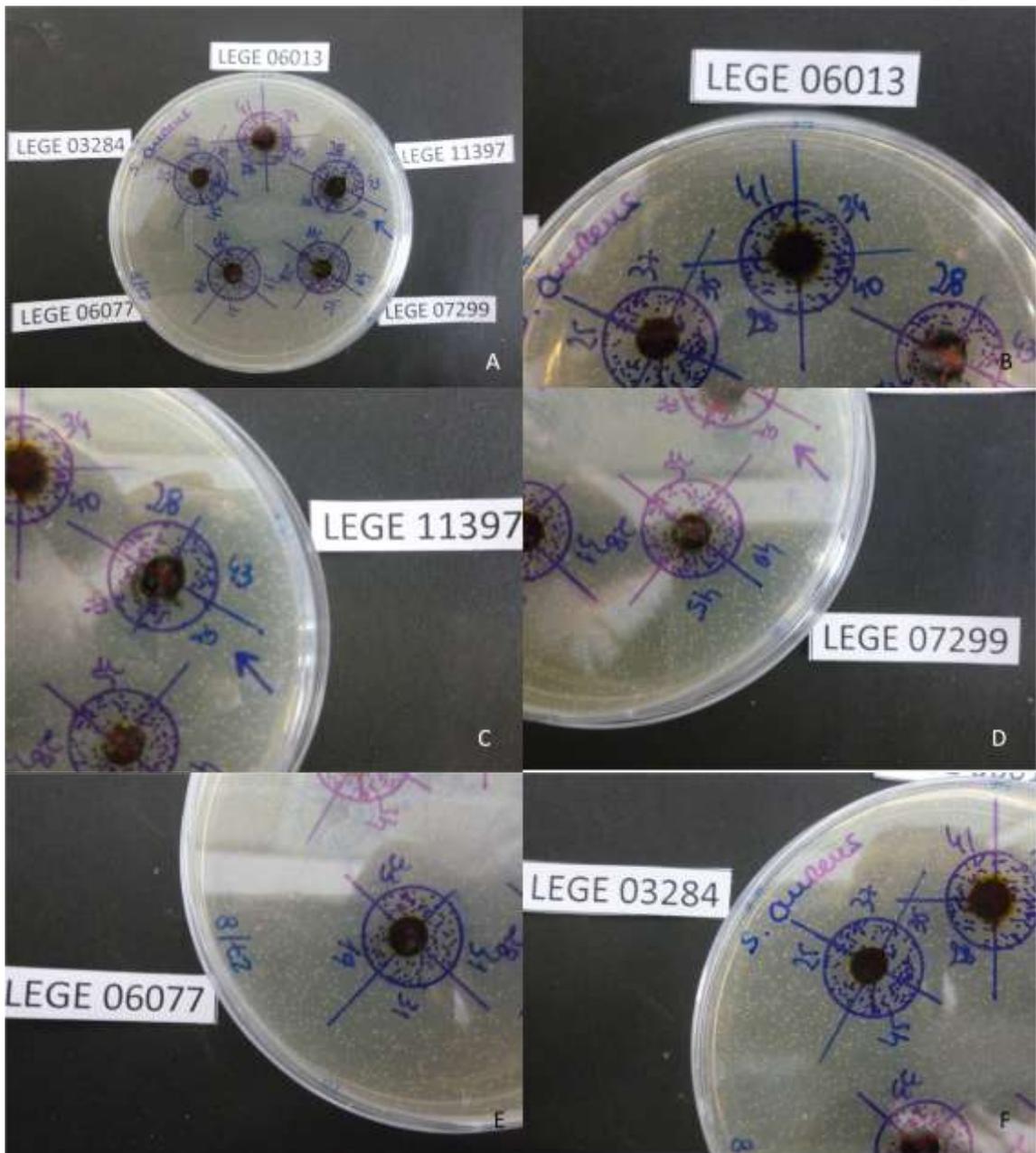
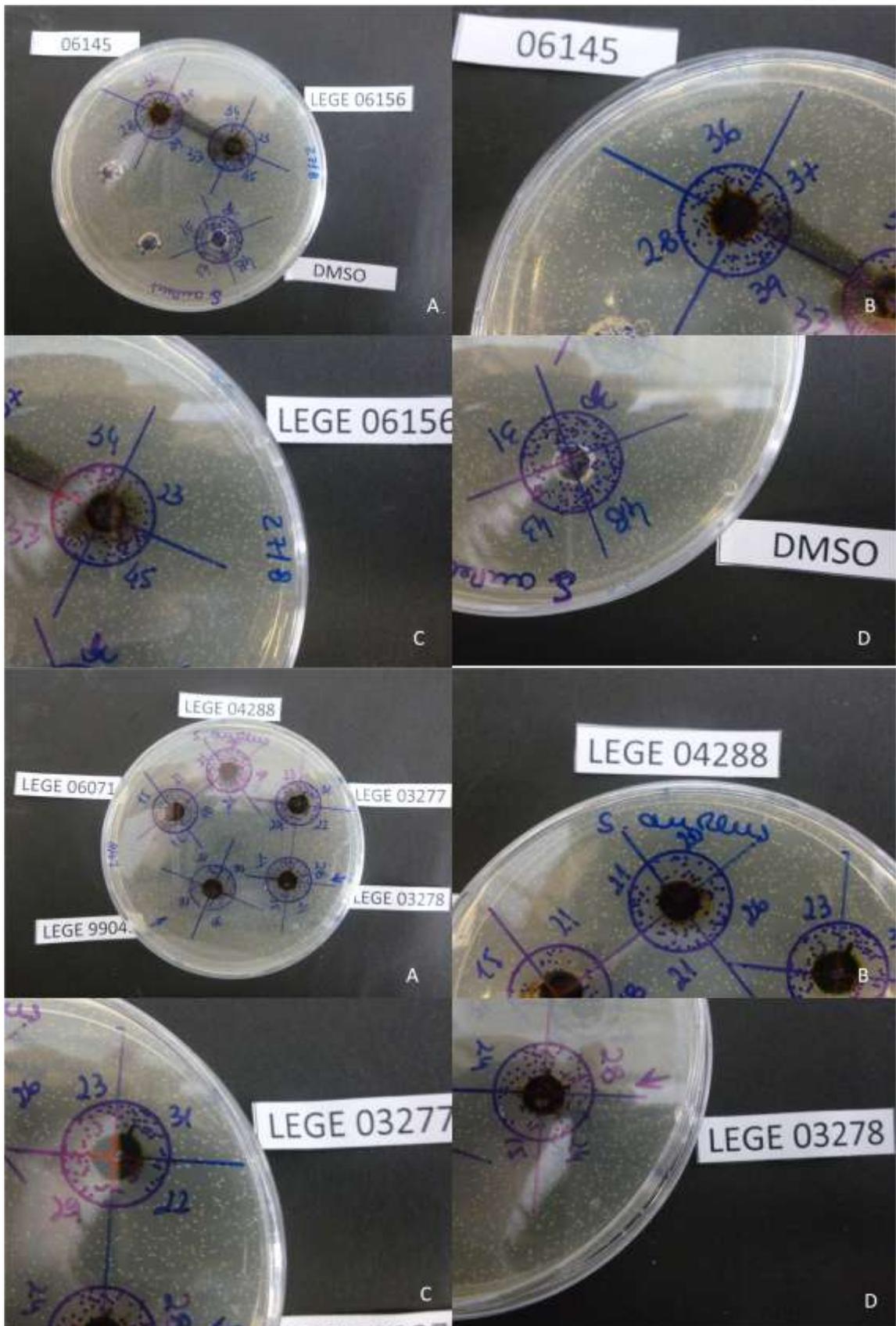
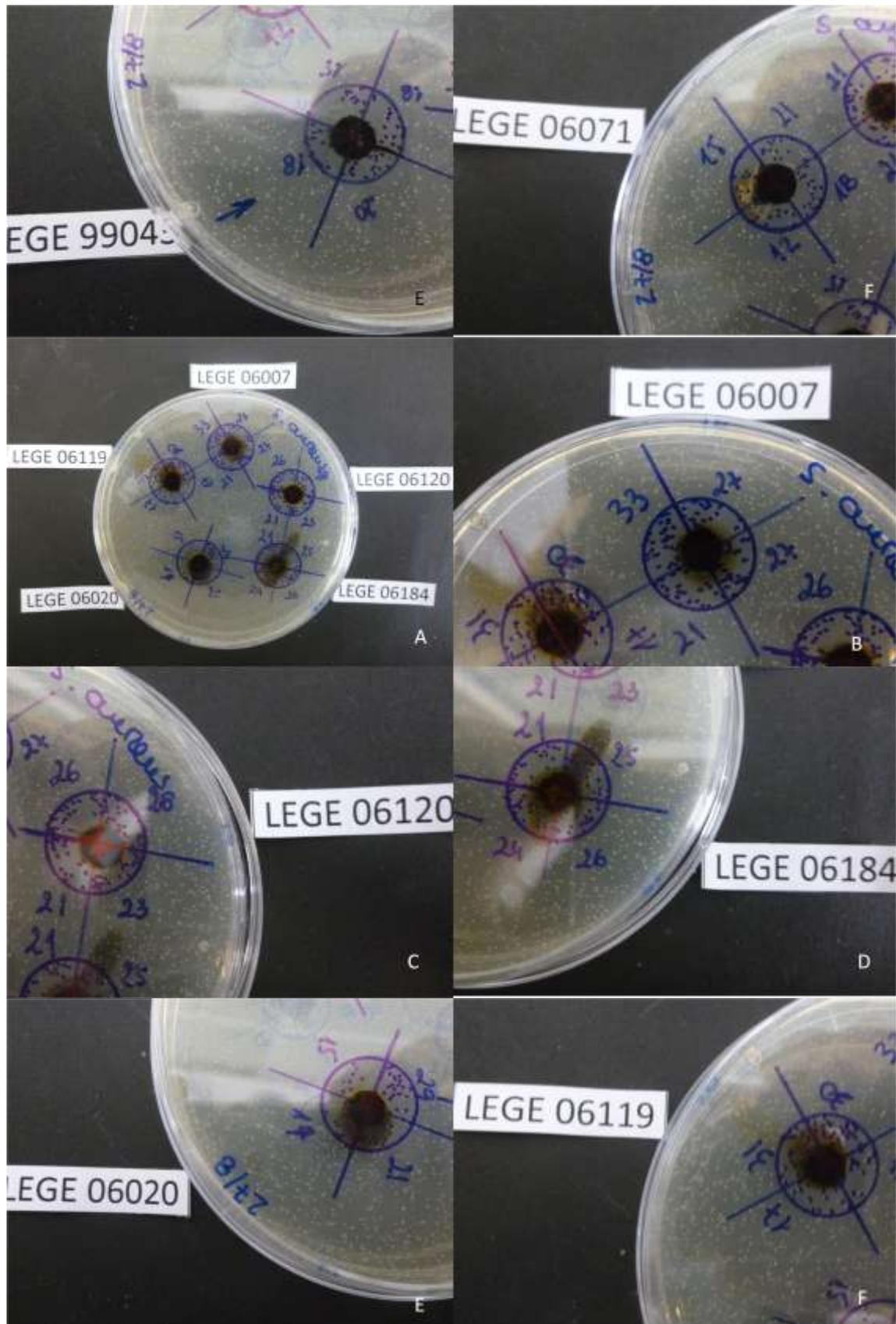


Figura 6.10: Antibiogramas para *S. thypimurium*





Figura 6.11: Antibiogramas para *S. aureus*

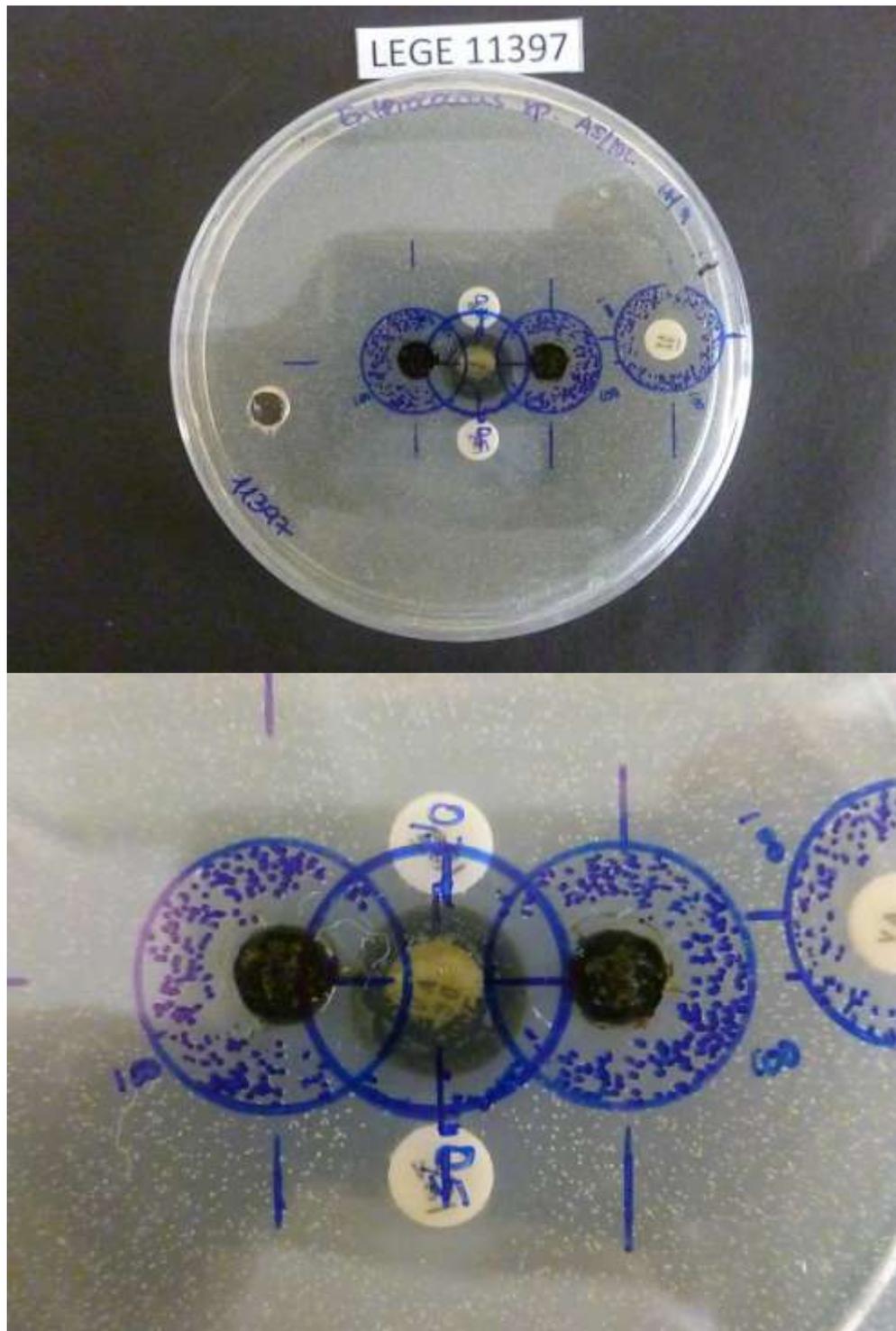


Figura 6.12: Sinergismo em *Enterococcus faecium* entre Vancomicina e extrato de *Tolypothrix* sp.

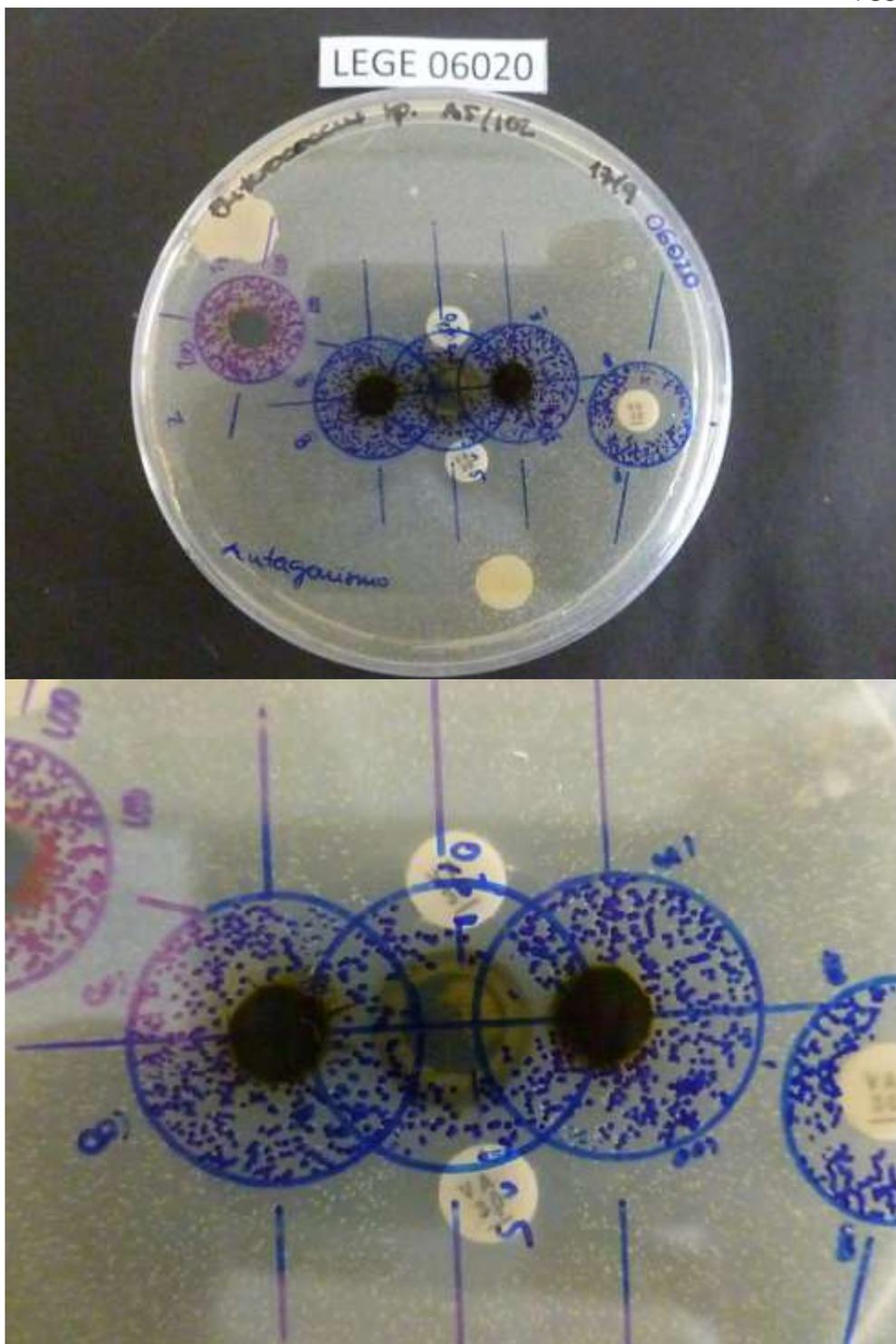


Figura 6.13: Sinergismo em *Enterococcus faecium* entre Vancomicina e extrato de *Leptolyngbya* sp.

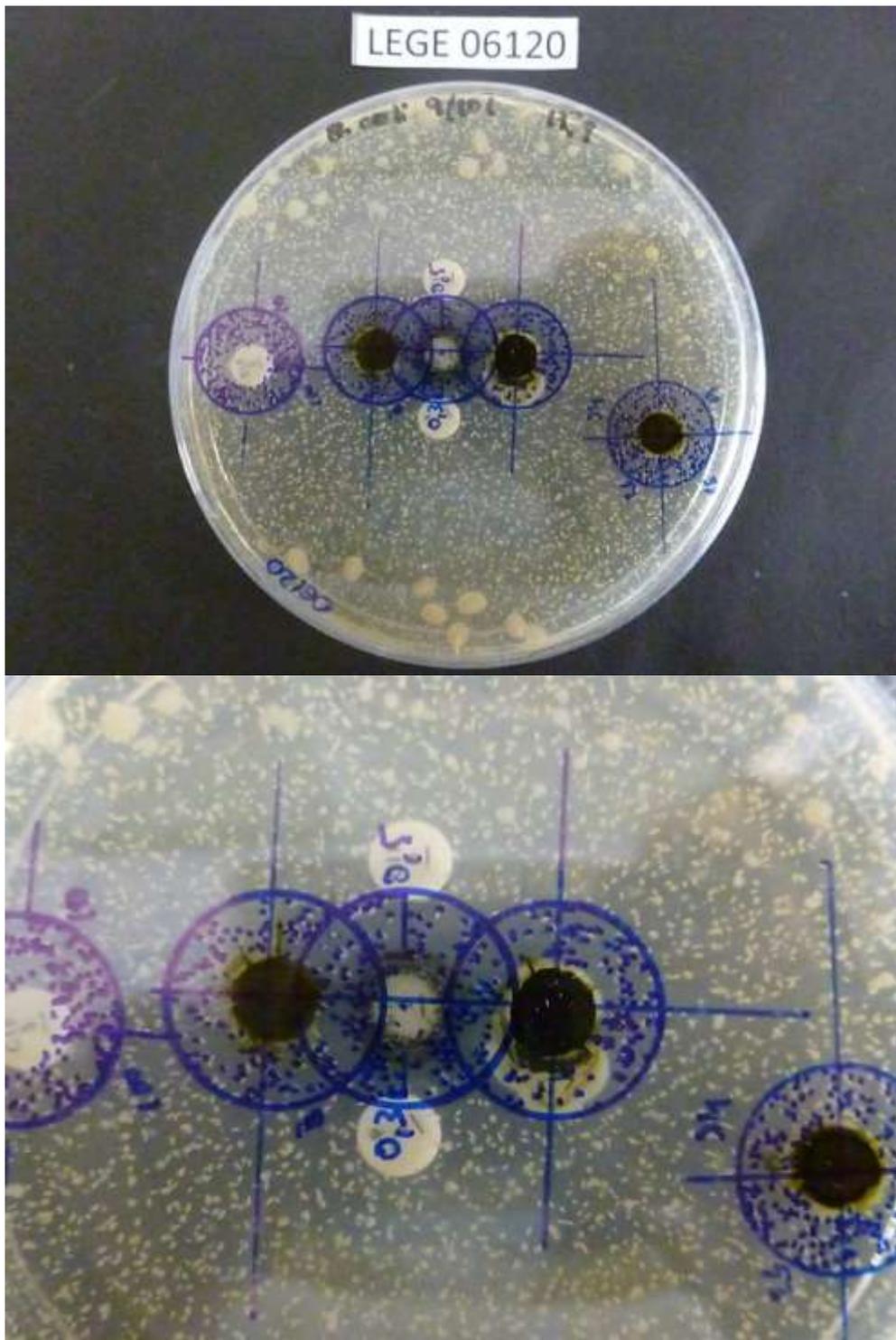


Figura 6.14: Sinergismo em *E. coli* entre Ciprofloxacina e extrato de *Leptolyngbya nodulosa*

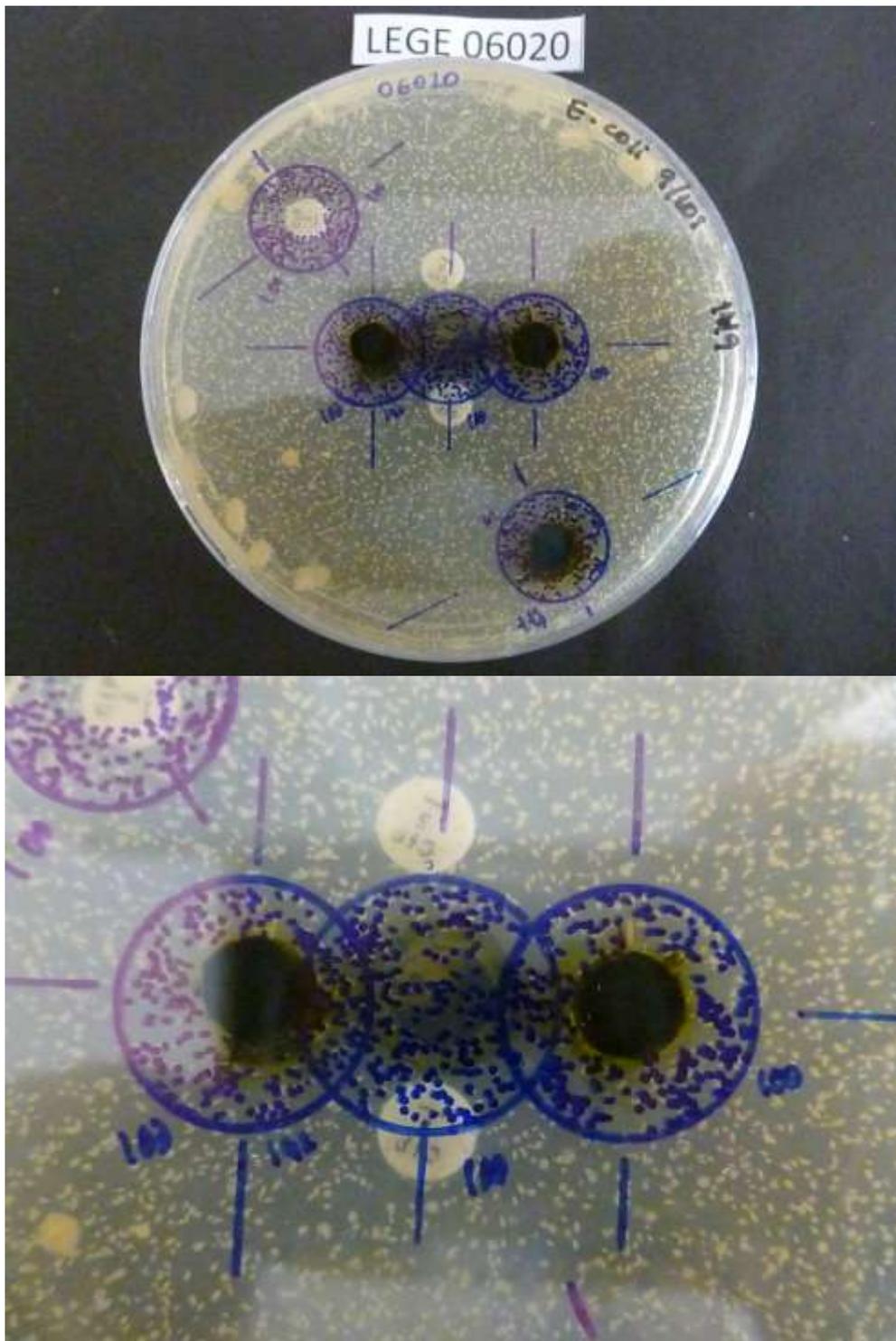


Figura 6.15: Sinergismo em *E. coli* entre Ciprofloxacina e extrato de *Leptolyngbya* sp.

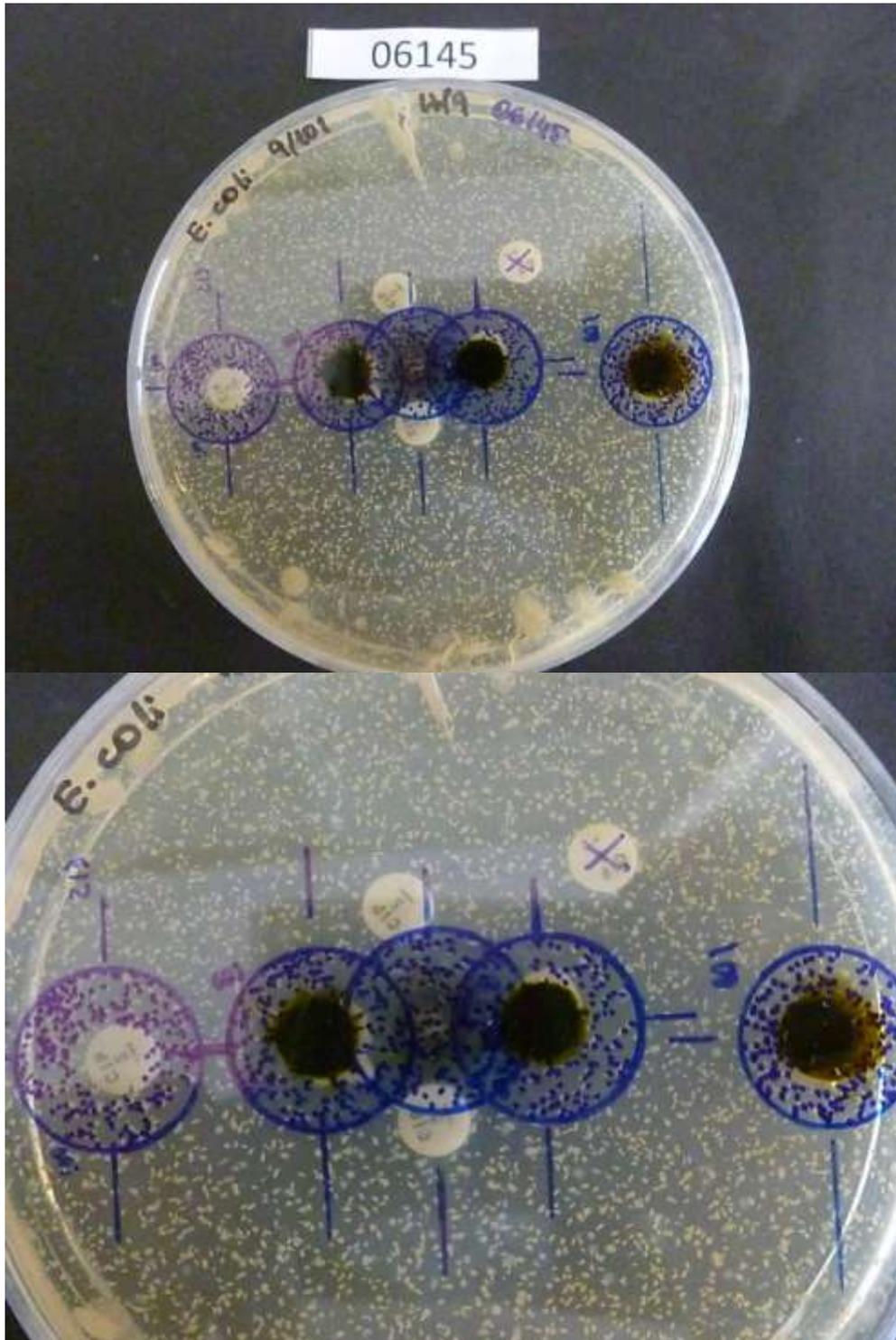


Figura 6.16: Sinergismo em *E. coli* entre Ciprofloxacina e extrato de *Pseudanabaena* sp.

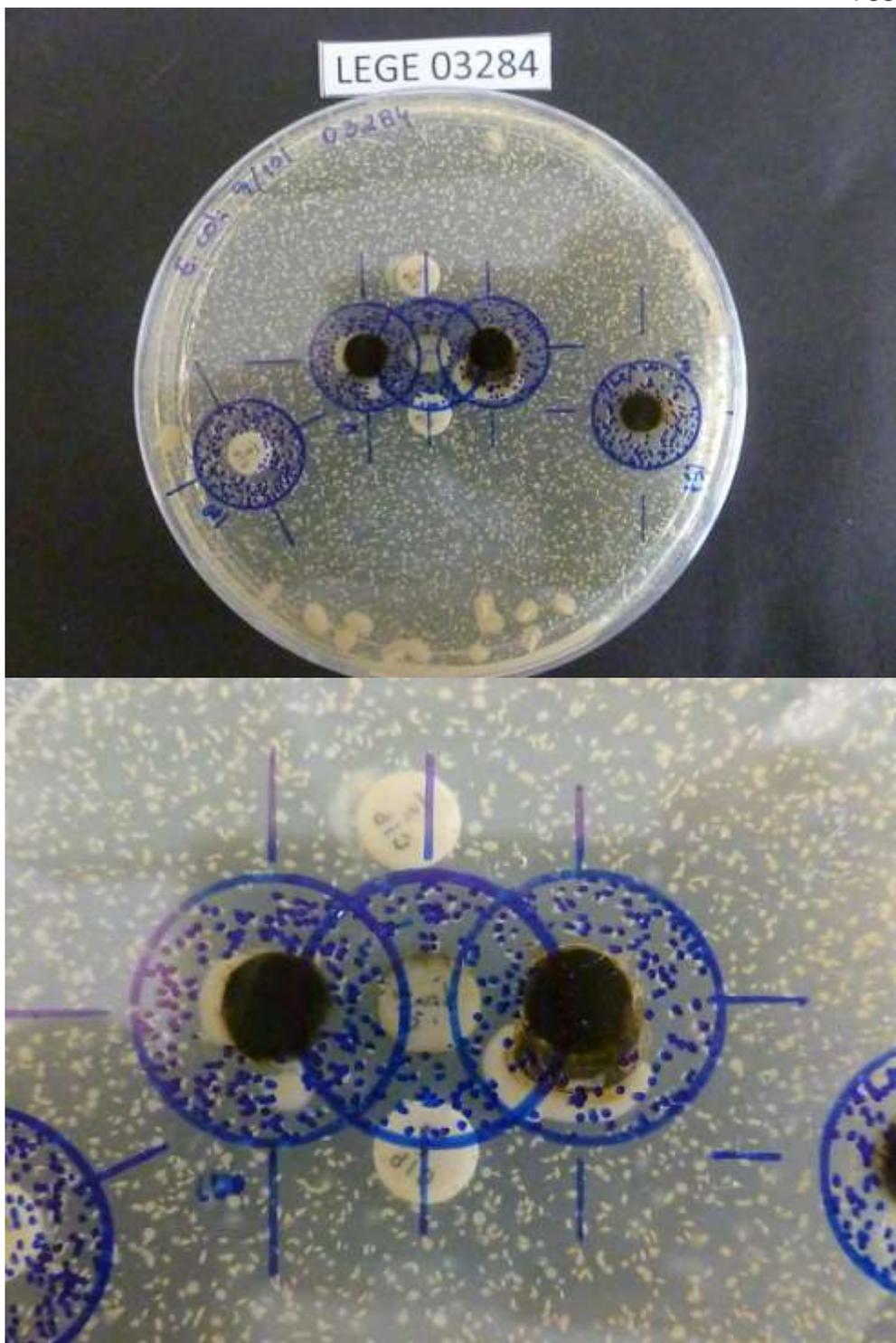


Figura 6.17: Sinergismo em *E. coli* entre Ciprofloxacina e extrato de *Anabaena* sp.

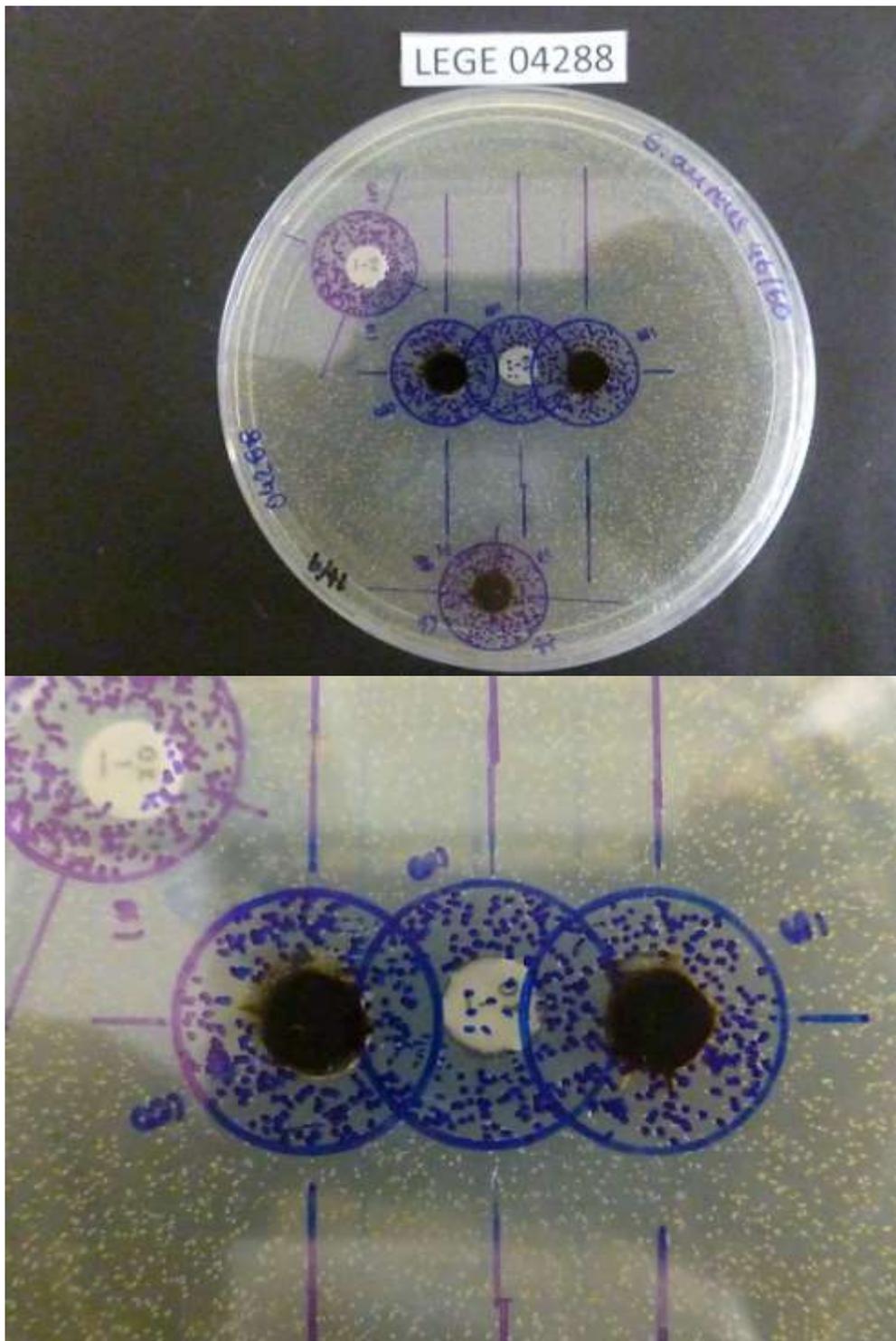


Figura 6.18: Sinergismo em *S. aureus* entre Oxacilina e extrato de *Anabaena* sp.

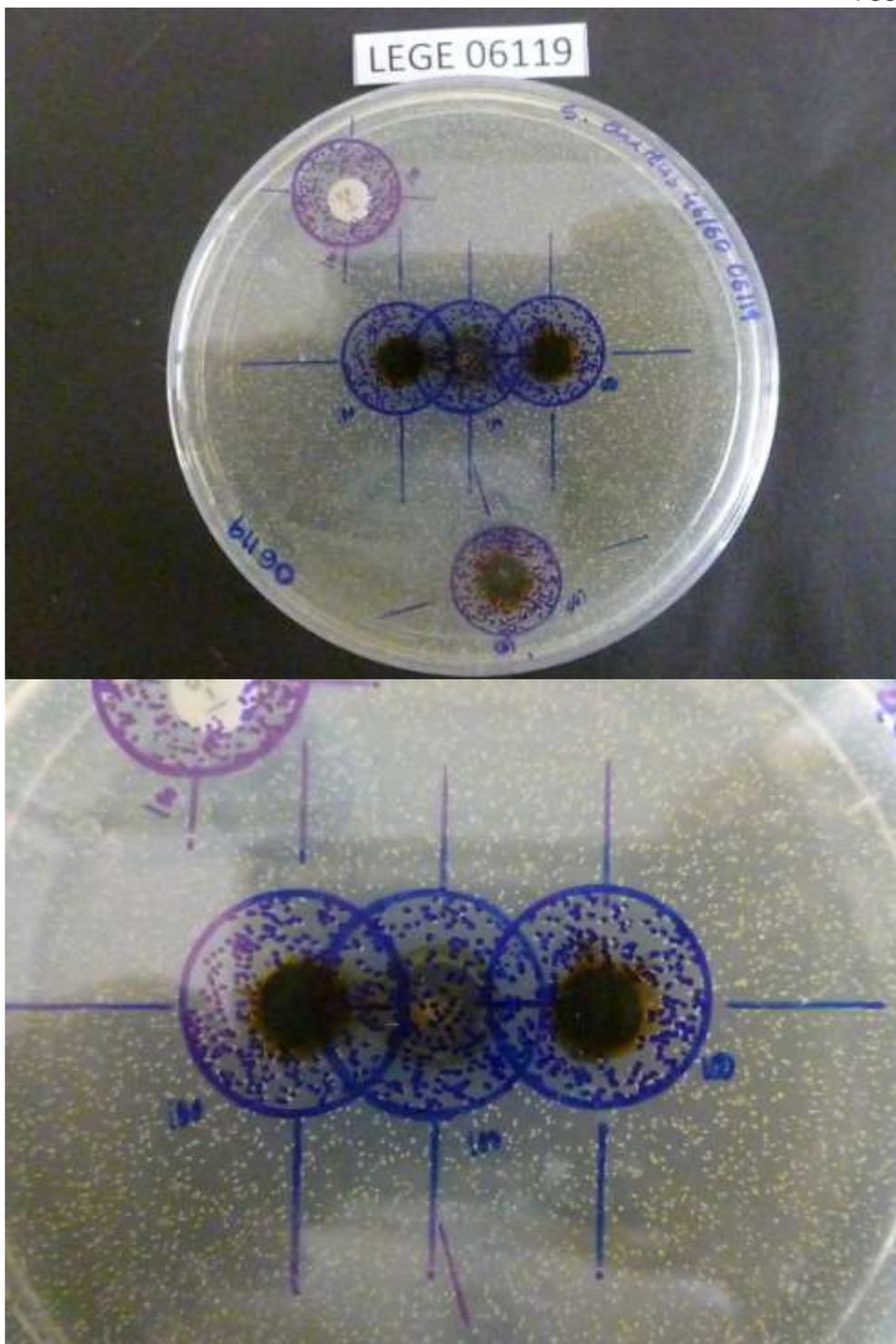


Figura 6.18: Sinergismo em *S. aureus* entre Oxacilina e extrato de *Pseudanabaena cf. frigida*

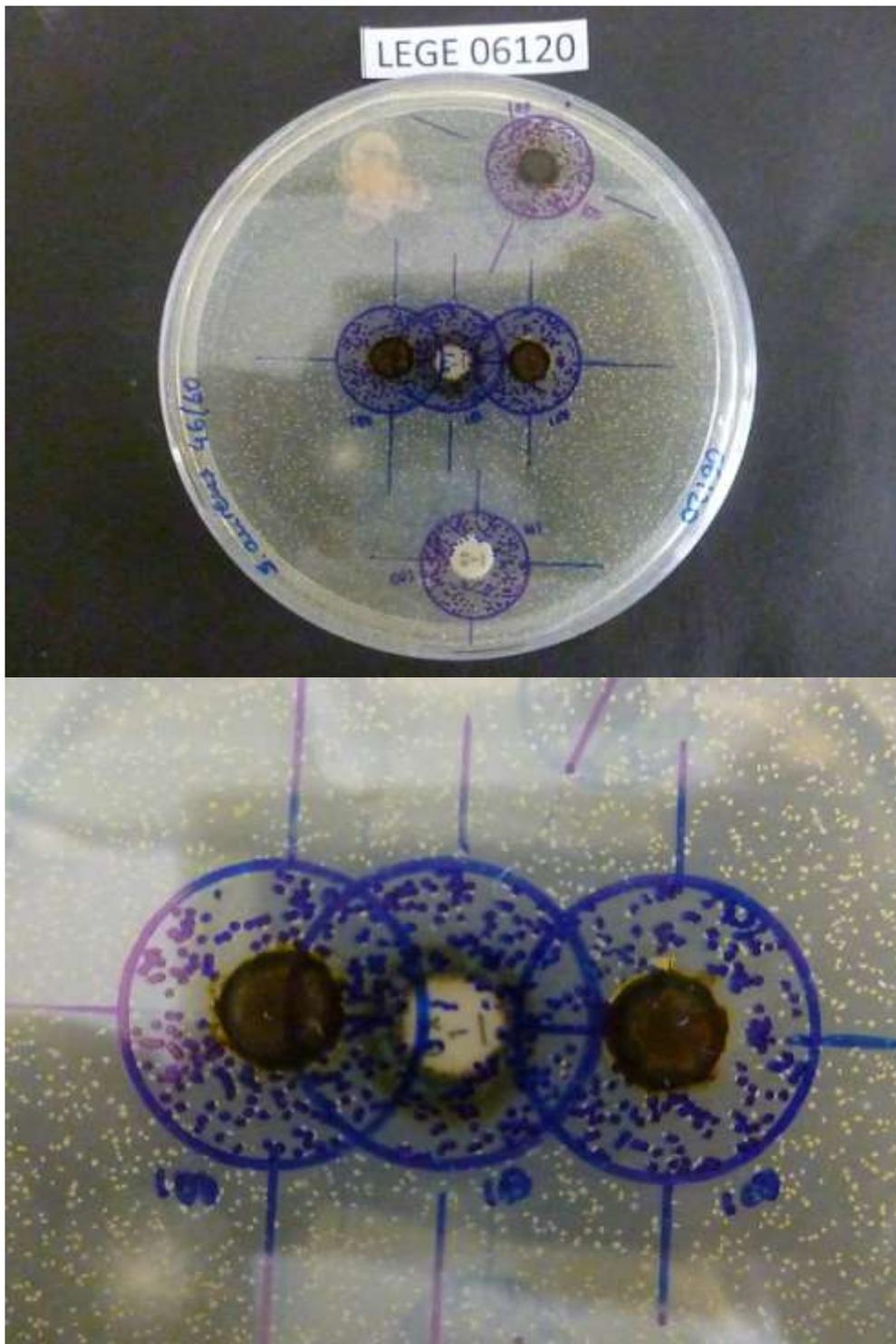


Figura 6.19: Sinergismo em *S. aureus* entre Oxacilina e extrato de *Leptolyngbya nodulosa*

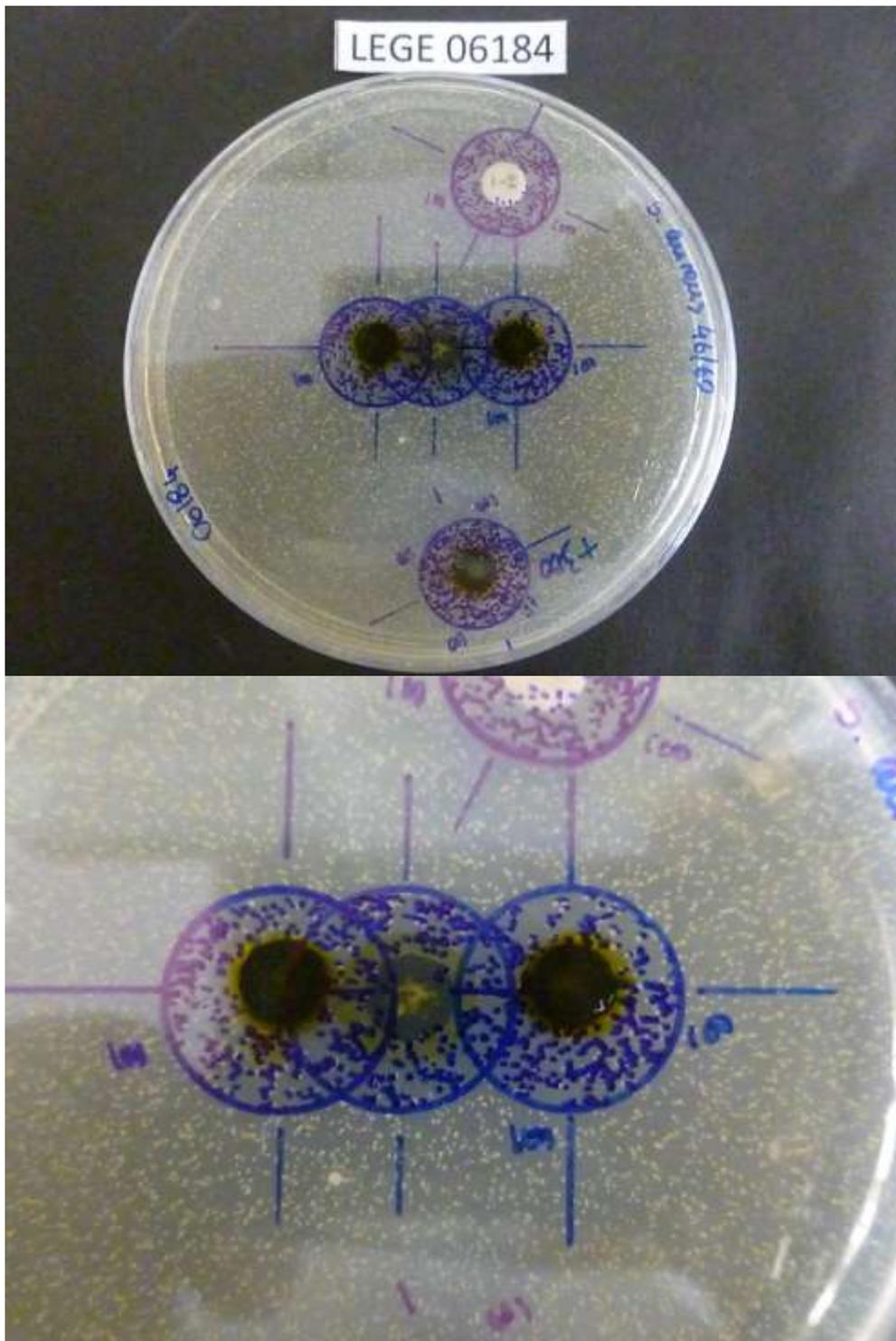


Figura 6.20: Sinergismo em *S. aureus* entre Oxacilina e extrato de *Cyanobium* sp.

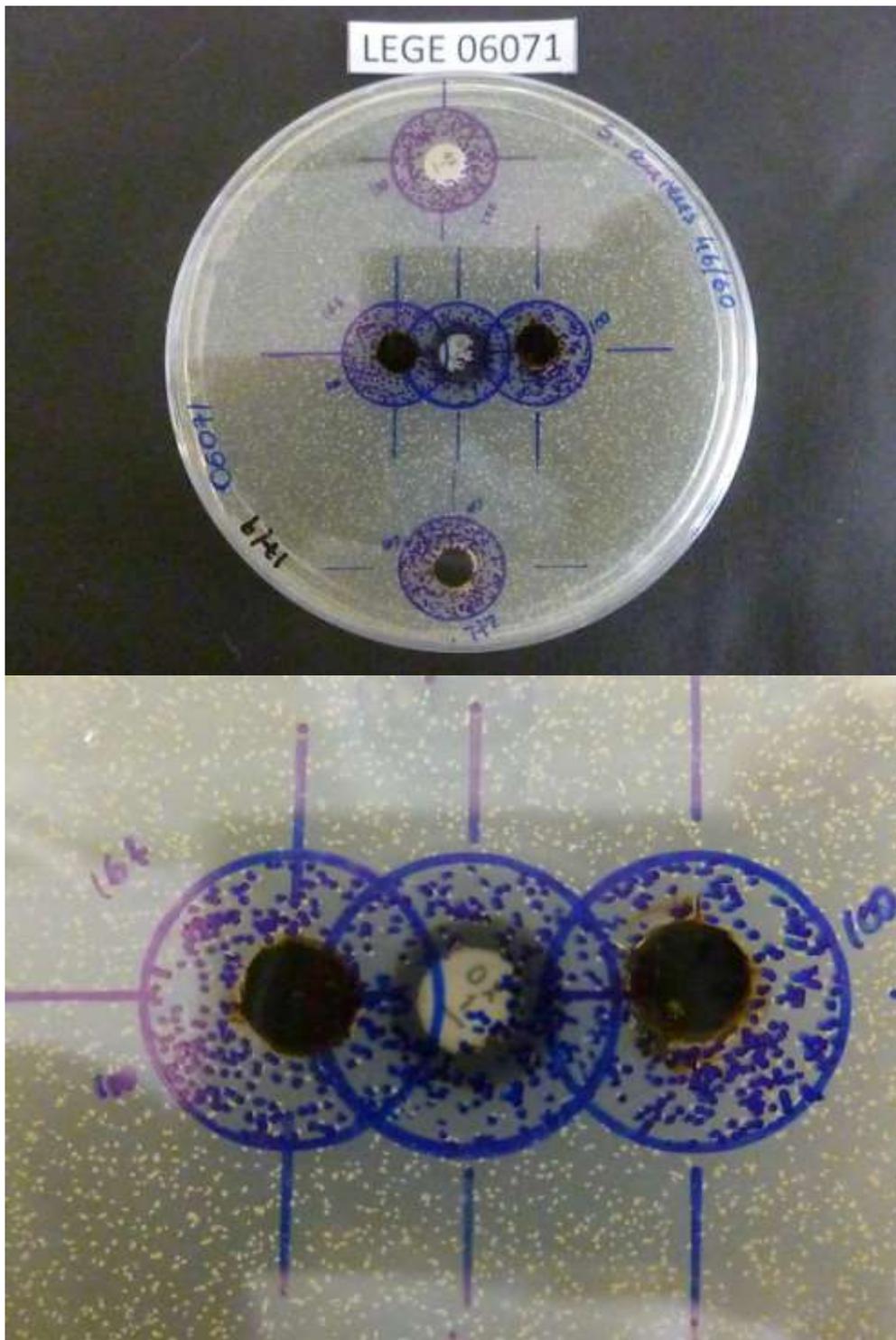


Figura 6.21: Sinergismo em *S. aureus* entre Oxacilina e extrato de *Nodularia* sp.

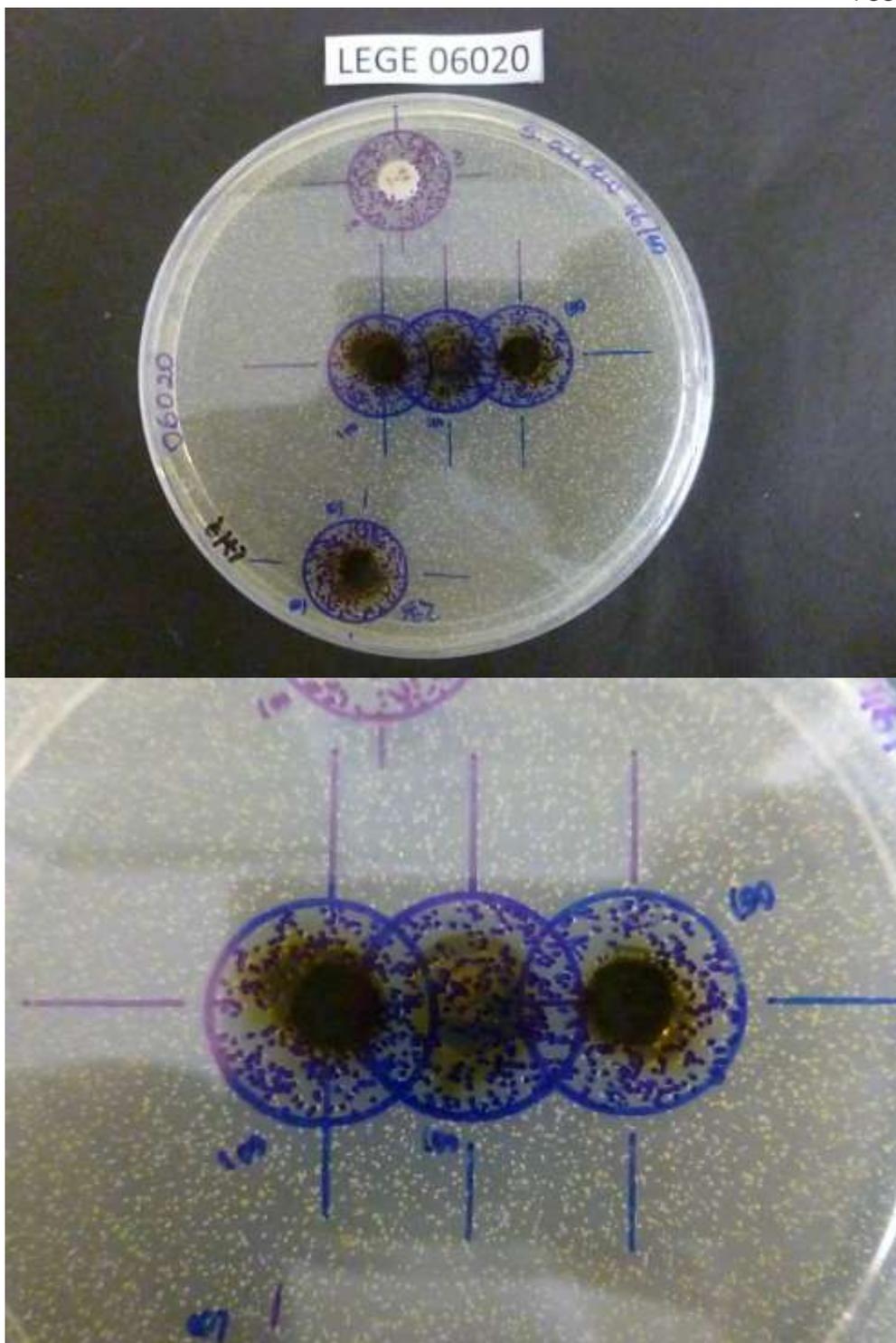


Figura 6.22: Sinergismo em *S. aureus* entre Oxacilina e extrato de *Leptolyngbya* sp.