



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

JOAQUIM DA SILVA PINTO NETO

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE
PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO PRODUZIDO PELA
CIANOBACTÉRIA AMAZÔNICA**
Lyngbya sp. CACIAM 07

BELÉM - PA
2024

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE
PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO PRODUZIDO PELA
CIANOBACTÉRIA AMAZÔNICA**
Lyngbya sp. CACIAM 07

Dissertação, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – PPGBIOTEC, do Instituto de Ciências Biológicas – ICB, da Universidade Federal do Pará - UFPA, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Linha de Pesquisa: Biotecnologia de Recursos Naturais Aplicada a Agroambiental.

Orientador: Prof. Dr. Agenor Valadares Santos.

BELÉM – PA
2024

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE
PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO PRODUZIDO PELA
CIANOBACTÉRIA AMAZÔNICA**
Lyngbya sp. CACIAM 07

Dissertação, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – PPGBIOTEC, do Instituto de Ciências Biológicas – ICB, da Universidade Federal do Pará - UFPA, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Linha de Pesquisa: Biotecnologia de Recursos Naturais Aplicada a Agroambiental.

Orientador: Prof. Dr. Agenor Valadares Santos.

Data de Aprovação:

Conceito:

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Agenor Valadares Santos Orientador – PPGBIOTEC/ICB/UFPA

Prof. Dr. Rafael Azevedo Baraúna – PPGBIOTEC/ICB/UFPA

Prof. Dr. Luís Adriano Santos do Nascimento – PPGBIOTEC/ICB/UFPA

Prof^a. Dr^a. Lílian Lund Amado - ICB/UFPA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P659p Pinto Neto, Joaquim da Silva.
Purificação, caracterização e avaliação de peptídeo antimicrobiano produzido pela cianobactéria amazônica *Lyngbya* sp. CACIAM 07 / Joaquim da Silva Pinto Neto, . — 2022.
51 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Agenor Valadares Santos Dissertação
(Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia,
Belém, 2022.

1. Cianobactérias, Peptídeo antimicrobiana, *Lyngbya* . I. Título.

CDD 660.6

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho ao meu falecido pai, que partiu antes de eu concluí-lo, mas de quem tenho certeza que estaria muito orgulhoso de mim. Agradeço por sempre acreditar nos meus sonhos, por lutar pela minha felicidade e por todos os ensinamentos, conselhos e lições que aprendi com o senhor.

Agradeço em especial a minha mãe e minha irmã por terem sido pessoas tão fortes na minha vida e terem sempre se dedicado a me ajudar, auxiliando a cumprir esse sonho e sempre me incentivando a seguir em frente. Obrigado pelo companheirismo que temos e por tudo que vocês fazem por mim.

Obrigado minha tia Cristina por ser a pessoa incrível que você é, um exemplo de pessoa a ser seguida. Obrigado por todo amor, carinho e incentivo que a senhora sempre demonstrou para mim.

Minha fonte de inspiração permanece a mesma, aquelas duas pessoas que me enchem de amor incondicional e que eu luto todo dia para agradá-las e deixá-las orgulhosas. Obrigado aos amores de minha vida, minhas avós Terezinha e Francisca.

Obrigado aos meus amigos que me acompanham desde a faculdade nessa vida acadêmica, que não é nada fácil. Obrigado então a Beatriz, Valéria, Naiana, Thiago, Giovane, Gustavo e Davi, por todas as discussões científicas, bobagens e brincadeiras ao longo de todos esses anos. Um obrigado especial ao meu amigo, irmão e parceiro de laboratório, Gustavo Marques, que me ajudou emocionalmente e fisicamente durante todo meu mestrado, me auxiliando dentro e fora do laboratório.

Agradeço aos meus amigos fora da vida acadêmica, que pacientemente me ouvem dissertar por horas sobre minha pesquisa, sempre demonstrando interesse e incentivando minha paixão. Um agradecimento especial a Beatriz, Ana Clara, Gabriela, Mayara, Ana Julia, Michelly, Natália, Armando, Raul e Walter, que me acompanham desde o ensino fundamental. Também sou grato a todos os amigos que fiz ao longo dos anos, e ao meu namorado, Luís, que chegou na reta final deste trabalho, mas me ajudou imensamente no aspecto emocional.

Aos meus orientadores, Agenor Valadares e Luciana Xavier, agradeço por todas as oportunidades que me foram apresentadas, por todas as conversas, conselhos, puxões de orelha e por todo o carinho que demonstraram por mim. Que meu trabalho sempre traga orgulho e felicidade para vocês dois.

RESUMO

As cianobactérias são microrganismos fotossintetizantes, que juntamente com as micro e macroalgas, são responsáveis pela maior parte do oxigênio liberado na atmosfera. Um mecanismo de defesa das cianobactérias é a produção de compostos que exercem atividades antimicrobianas, alelopáticas, antiparasitárias, que protegem o organismo contra ataques de outras espécies de cianobactérias, predadores e microrganismos em geral. O gênero *Lyngbya* é um dos mais estudados pela sua promissora produção de moléculas de interesse biotecnológico; peptídeos, proteínas, metabólitos secundários que podem ser utilizados em diversas áreas para reverter problemas que afligem a sociedade e o meio ambiente, como pragas em plantações, contaminação em alimentos até a falta de novos antimicrobianos comerciais. O objetivo deste trabalho foi obter, avaliar e caracterizar o peptídeo com atividade antimicrobiana produzido pela cianobactéria amazônica *Lyngbya* sp. CACIAM 07. O extrato foi obtido a partir da biomassa seca da cianobactéria, sua atividade antimicrobiana, por difusão em poços, foi avaliada contra bactérias gram-positivas (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Listeria monocytogenes* ATCC 6477 e *Corynebacterium fimi* NTC 5) e gram-negativa (*Salmonella typhimurium* ATCC 14021). A maior atividade frente às bactérias reveladoras foi do extrato aquoso que inibiu o crescimento de três das quatro bactérias utilizadas neste trabalho, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Salmonella typhimurium* ATCC 14021 e *Listeria monocytogenes* ATCC 6477, e também inibiu o crescimento da cianobactéria *Cyanobium* sp. CACIAM 14. O extrato aquoso bruto foi fracionado através da cromatografia de exclusão molecular e depois por cromatografia líquida de fase reversa, e as frações recolhidas foram testadas para atividade antimicrobiana e alelopática. A fração C7B1 apresentou melhor atividade frente a *Bacillus subtilis* ATCC 6633 e *Salmonella typhimurium* ATCC 14021, e mostrou atividade alelopática frente a cianobactéria *Synechococcus* sp. CACIAM 66. A partir dos cromatogramas foi possível aferir a faixa de massa molecular, ~12 kDa, o que condiz com a faixa para peptídeo antimicrobiano. Desta forma, neste trabalho foi possível isolar, analisar e caracterizar parcialmente a atividade de provável AMP obtido da *Lyngbya* sp. CACIAM 07, uma cianobactéria isolada da região amazônica, ressaltamos que nenhuma molécula com atividade antimicrobiana e alelopática, desta cepa, possui descrição na literatura até o momento.

ABSTRACT

Cyanobacteria are photosynthesizing microorganisms that, together with micro and macroalgae, are responsible for most of the oxygen released into the atmosphere. One defense mechanism of cyanobacteria is the production of compounds that exhibit antimicrobial, allelopathic, and antiparasitic activities, protecting the organism against attacks from other species of cyanobacteria, predators, and microorganisms in general. The genus *Lyngbya* is one of the most studied due to its promising production of molecules of biotechnological interest, such as peptides, proteins, and secondary metabolites, which can be used in various areas to address problems that afflict society and the environment, such as crop pests, food contamination, and the lack of new commercial antimicrobials. The aim of this study was to obtain, evaluate, and characterize the peptide with antimicrobial activity produced by the Amazonian cyanobacterium *Lyngbya* sp. CACIAM 07. The extract was obtained from the dried biomass of the cyanobacterium, and its antimicrobial activity was evaluated by well diffusion against gram-positive (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Listeria monocytogenes* ATCC 6477, and *Corynebacterium fimi* NCTC 5) and gram-negative (*Salmonella typhimurium* ATCC 14021) bacteria. The aqueous extract showed the greatest activity against the target bacteria, inhibiting the growth of three of the four bacteria used in this study: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Salmonella typhimurium* ATCC 14021, and *Listeria monocytogenes* ATCC 6477. It also inhibited the growth of the cyanobacterium *Cyanobium* sp. CACIAM 14. The crude aqueous extract was purified using molecular exclusion chromatography and then reversed-phase liquid chromatography. The collected fractions were tested for their antimicrobial and allelopathic activity, with fraction C7B1 showing the best activity against *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Salmonella typhimurium* ATCC 14021 and demonstrating allelopathic activity against *Synechococcus* sp. CACIAM 66. According to the chromatograms, it was possible to determine the size of the molecule, which was 12 kDa, consistent with an antimicrobial peptide. Thus, in this work, it was possible to isolate, analyze, and partially characterize the activity of the possible AMP obtained from *Lyngbya* sp. CACIAM 07, a cyanobacterium isolated from the Amazon region. We would point out that no molecule with antimicrobial or allelopathic activity from this strain has been described in the literature to date.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fotomicrografia de um filamento isolado (A) e da cultura (B) de *Lyngbya* sp. CACIAM 07. Visualização em Microscópio óptico Leica DM500 sob aumento de 1000x.

Fonte: o autor. 15

Figura 2 - Culturas da *Lyngbya* sp. CACIAM 07 em diferentes meios de cultura. (1) ASM-1. (2) BG-11. (3) CHU-10. Fonte: Autor. 29

Figura 3 - (1) Culturas sob aeração constante. (2) Biomassa coletada e o meio de cultura.

Fonte: Autor

30

Figura 4. (1) Cultura somente com o meio Bg-11. (2) Cultura com meio Bg-11 mais hidrolisado de cupuaçu e fosfato de potássio.

31

Figura 5. (1) Atividade antimicrobiana do extrato aquoso bruto frente às bactérias reveladoras (2) Halos de inibição das frações do extrato aquoso bruto frente a bactéria *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Fonte: Autor.

32

Figura 6. Atividade antimicrobiana do extrato metanólico bruto frente às bactérias reveladoras.

33

Figura 7. Atividade antimicrobiana do extrato clorofórmico bruto frente às bactérias reveladoras.

33

Figura 8: Halos de inibição frente a bactéria *Bacillus subtilis* no ensaio de atividade antimicrobiana em placa, com diluição do extrato aquoso bruto .

34

Figura 9: Cromatograma de exclusão molecular em coluna Superose 12 (1) e halos de inibição (2) das frações do extrato aquoso bruto frente a bactéria *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Em destaque, dentro do quadrado laranja, as frações que apresentaram atividade antimicrobiana. Linha preta – 280 nm. Fonte: Autor.

35

Figura 10: Mensuração dos halos de inibição das frações reunidas e concentrada, frente as bactérias *Bacillus subtilis* ATCC 6633 e *Salmonella typhimurium* ATCC 14021

36

Figura 11. Cromatograma (1) e halos de inibição (2) das frações de C7B1 frente a bactéria *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Em destaque, dentro do quadrado laranja, as frações que apresentaram atividade antimicrobiana. Linha preta –280 nm. Fonte: Autor.37

Figura 12. Mensuração dos halos de inibição das frações de C7B1 frente a bactéria *Bacillus subtilis* ATCC 6633. 38

Figura 13: Cromatograma de fase reversa (1) e halos de inibição (2) das frações coletadas da fase reversa frente a bactéria *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Em destaque, dentro do quadrado laranja, a fração que apresentou atividade antimicrobiana. Linha preta – 280 nm. Fonte: Autor. 40

Figura 14: (1) Atividade alelopática do extrato aquoso bruto e metanólico bruto frente a *Cyanobium* sp. CACIAM 14. (2) Atividade alelopática das frações concentradas frente a *Cyanobium* sp. CACIAM 14. (3) Atividade alelopática do extrato bruto e frações concentradas frente a *Synechococcus* sp. CACIAM 66. 43

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Composição do meio ASM-1 (GORHAM <i>et al</i> , 1964 e ZAGATTO & ARAGÃO 1992). | 21 |
| Tabela 2 - Composição do meio CHU-10. *Composição Micronutrientes na tabela 4 | 22 |
| Tabela 3 - Composição do meio BG-11 (RIPPKA <i>et al</i> , 1979) | 22 |
| Tabela 4 - Solução de micronutrientes do meio BG-11 e CHU-10 (RIPPKA <i>et al</i> , 1979) | 22 |
| Tabela 5: Relação das cianobactérias e sua função no ensaios de alelopatia e antimicrobiano | 23 |
| Tabela 6 - Bactérias reveladoras selecionadas para os ensaios e suas respectivas caracterizações. | 24 |
| Tabela 7. Peso da biomassa liofilizada da <i>Lyngbya</i> sp. CACIAM 07 em diferentes condições. | 30 |
| Tabela 8. Teste de atividade antimicrobiana da amostra, mais as substâncias necessárias para a cromatografia de fase reversa . | 39 |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 11 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 13 |
| 2.1 Cianobactérias | 13 |
| 2.2 O gênero Lyngbya | 14 |
| 2.3 Peptídeos antimicrobianos (AMPs) | 16 |
| 2.4 Mecanismo de ação dos AMP | 17 |
| 2.5 Peptídeos antimicrobianos versus antibióticos | 17 |
| 2.6 Compostos alelopáticos das cianobactérias | 18 |
| 3. OBJETIVOS | 20 |
| 3.1 Objetivo Geral | 20 |
| 3.2 Objetivo Específicos | 20 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 21 |
| 4.1 Seleção do meio de cultura | 21 |
| Meio ASM-1 | 21 |
| Meio CHU N°10 | 22 |
| Meio BG-11 | 22 |
| *Solução de Micronutrientes | 22 |
| 4.2 Cultivo | 23 |
| 4.2.1 Cianobactérias | 23 |
| 4.2.2 Bactérias reveladoras | 23 |
| 4.2.3 Leveduras reveladoras | 24 |
| 4.3 Otimização do meio de cultura | 24 |
| 4.4 Extração | 25 |
| 4.5 Atividade antimicrobiana do extrato bruto e frações | 25 |
| 4.6 Atividade alelopática da cianobactéria e do extrato bruto | 25 |
| 4.7 Microdiluição em placa | 26 |
| 4.8 Cromatografia de exclusão molecular | 26 |
| 4.9 Cromatografia de fase reversa | 26 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 28 |
| 5.1 Seleção do meio de cultura | 28 |
| 5.2 Aeração constante da cultura | 29 |
| 5.3 Adição do hidrolisado de cupuaçu e fosfato de potássio | 31 |
| 5.4 Escolha do extrato | 31 |
| 5.5 Microdiluição em placa | 34 |
| 5.6 Cromatografia de exclusão molecular e atividade antibacteriana das frações | 34 |
| 5.7 Cromatografia líquida de fase reserva e atividade antibacteriana das frações. | 39 |
| 5.8 Atividade antifúngica do extrato bruto e frações | 42 |
| 5.9 Atividade alelopática da biomassa, extrato bruto e frações | 42 |
| 6. CONCLUSÃO | 43 |

1. INTRODUÇÃO

As cianobactérias são microrganismos de grande interesse para diversas indústrias. Isso ocorre principalmente pela síntese de moléculas com aplicabilidades biotecnológicas. Esses microrganismos surgiram no radar da sociedade como vilões, pois estão associados a um problema ambiental comum em diversos países: a eutrofização. Esse problema consiste no acúmulo de nutrientes em corpos d'água, como lagos, rios e oceanos. Esses locais são habitats de diversas espécies de cianobactérias. Ao consumirem esses nutrientes de forma exagerada, as cianobactérias se reproduzem de maneira descontrolada. Elas cobrem a superfície da água, desequilibram a vida do habitat pela falta de luz e provocam estresse nas próprias cianobactérias. Com isso, liberam metabólitos de defesa para se proteger da superpopulação de outras espécies (SIQUEIRA; OLIVEIRA & FILHO, 2008).

As aplicabilidades biotecnológicas das cianobactérias são inúmeras. Elas são conhecidas por gerarem diversos produtos de áreas industriais diferentes, como biocombustível, biofertilizante para plantas e suplemento alimentício (ABED et al., 2009). Na área farmacêutica e alimentícia, os metabólitos primários e secundários são de grande interesse. Eles são usados na fabricação de novos produtos, desde medicamentos até o controle de pragas. Segundo revisão feita por Ishtiaq Ahmed, em 2022, diversos peptídeos bioativos já foram encontrados ao longo do bioma marinho. Essas substâncias vieram de diferentes fontes, como cianobactérias, bactérias, fungos e plantas. O estudo aponta várias bioatividades, como antifúngica e antibacteriana, produzidas por peptídeos derivados de cianobactérias.

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) são pequenas moléculas com número variável de aminoácidos, de cinco a mais de cem. Eles apresentam ampla atuação contra organismos-alvo, combatendo fungos, bactérias, vírus e parasitas (BAHAR & REN, 2013). São produzidos por mamíferos, anfíbios, insetos e microrganismos. Os AMPs não são apenas potentes antimicrobianos. Também são componentes de defesa importantes, contribuindo para o sistema autoimune contra microrganismos invasores e mediando a imunidade humoral (JIAN-YIN et al, 2011).

É possível encontrar na literatura estudos sobre o potencial biotecnológico e a atividade dos peptídeos antimicrobianos produzidos por espécies do gênero *Lyngbya* (LIU & REIN, 2010; STENICO et al, 2010; ROJAS et al, 2020). No entanto, nas buscas por patentes nas plataformas INPI, ESPACENET e WIPO, não foram encontradas patentes relacionadas ao processo de obtenção, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos da *Lyngbya*. Tampouco foram encontrados produtos que utilizam esses peptídeos.

Também não foram encontradas patentes sobre o processo de extração e purificação de uma *Lyngbya* da região Norte do Brasil, em nenhuma das três plataformas. É muito

importante aprofundar os estudos sobre os compostos produzidos por cianobactérias, principalmente de espécies amazônicas. Essas espécies ainda foram pouco exploradas e podem apresentar características diferentes de outras da mesma espécie. Já descritos na literatura, os AMPs são de grande interesse para farmacologia, biotecnologia e bioprocessos. Eles podem ser utilizados na fabricação de fármacos, nas indústrias de alimentos e em produtos agrícolas (KEYMANESH et al, 2009). Por apresentarem atividade antimicrobiana, os AMPs tornaram-se moléculas de grande importância. Isso se dá no estudo de novos tratamentos contra bactérias resistentes a antibióticos. Além disso, já são utilizados em conjunto com antibióticos em novas terapias (WILLYARD et al, 2017).

Pesquisadores estão constantemente em busca de novos extratos naturais e frações bioativas. Essas substâncias provêm de diferentes fontes, com o objetivo de identificar compostos com propriedades farmacológicas relevantes. Entre essas propriedades estão as atividades antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, entre outras (C. COVINGTON et al, 2016). Um dos principais desafios nesse processo é identificar a molécula responsável pela atividade observada, especialmente em matrizes complexas. Nesse contexto, a espectrometria de massas (EM) se destaca como ferramenta analítica indispensável nos laboratórios de pesquisa. Ela permite a caracterização molecular detalhada dos compostos presentes. Isso viabiliza a identificação de substâncias conhecidas e a descoberta de novas moléculas bioativas (C. COVINGTON et al, 2016; H. GROSS, 2017).

A metodologia empregada neste trabalho difere das abordagens convencionais. Ela possui potencial para patenteamento, especialmente nos processos de extração e purificação das moléculas presentes no extrato de *Lyngbya* sp. CACIAM 07. O resultado esperado é a purificação parcial, caracterização e identificação de um peptídeo com atividade antimicrobiana. Esse peptídeo pode já ter sido descrito na literatura ou ser uma molécula inédita. Caso seja nova, seu uso também poderá ser patenteável. Características físicas e bioquímicas, como termoestabilidade, estabilidade de pH e grau toxicológico, devem ser avaliadas. Isso permitirá identificar a melhor forma de ação do peptídeo, visando sua aplicação nas indústrias e geração de novos processos e produtos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cianobactérias

As cianobactérias são microrganismos procariontes autotróficos pertencentes ao domínio Bacteria. Esses microrganismos executam o processo de fotossíntese, tendo esse processo como sua fonte de energia, e liberam oxigênio como produto para o meio, sendo uma importante fonte desse elemento (YUSOF et al, 2017). As cianobactérias emergiram por volta de 3,5 bilhões de anos atrás, sendo um dos primeiros habitantes do planeta terra, e possivelmente o primeiro ser vivo a realizar fotossíntese, permitindo uma atmosfera aeróbica que criou as condições ideais para a vida que encontramos até hoje (MUNDT et al, 2001; KULASOORIYA, 2011).

Sua estrutura celular se assemelha ao de bactérias gram-negativas, e por estarem presente em diferentes habitats, as diversas espécies desses microrganismos apresentam diferentes morfologias, podendo ser cocóides, filamentosas e formadoras de colônias, essas diferenças morfológicas estão diretamente ligadas a adaptação aos vários ecossistemas, já que as espécies vão crescer sobre diferentes fatores ambientais, nutrientes, quantidade de luz e água, o clima e temperatura, e isso influenciou diretamente na evolução desses seres (CASTENHOLZ 2001, DEMOULIN et al, 2019). Quando descobertas, as cianobactérias foram erroneamente classificadas como algas, devido sua aparência e habilidade fotossintetizante, quando em 1979, o estudo de Ripkar e colaboradores reconheceu esses microrganismos como procariontes, adicionando as cianobactérias ao domínio Bacteria e sinalizando que deveriam seguir o Código Internacional de Nomenclatura de Bactérias.

Esses microrganismos são conhecidos por estarem distribuídos em diferentes habitats, porém, a maior parte das cianobactérias crescem particularmente em ambientes aquáticos, tanto de água doce, como salgada. (COSTA, 2011). O crescimento em vários ecossistemas está diretamente ligado aos nutrientes presentes nesse meio, tendo os elementos fósforo e nitrogênio como os nutrientes necessários para a floração da maioria das espécies de cianobactérias (WHITTOM & POTTS, 2000). As cianobactérias podem sobreviver em quase todos os habitats, desde oceanos à desertos, podendo prevalecer sobre temperaturas variadas.

Como resultado dessa evolução na sobrevivência, as cianobactérias podem exibir uma série de metabólitos secundários, enzimas e peptídeos que as ajudam em diversas situações, principalmente na defesa (RASTOGI *et al*, 2009). Os metabólitos secundários são moléculas orgânicas que têm um importante papel evolutivo em diversas espécies de plantas, animais e microrganismos. Por mais que não estejam diretamente ligados ao crescimento e

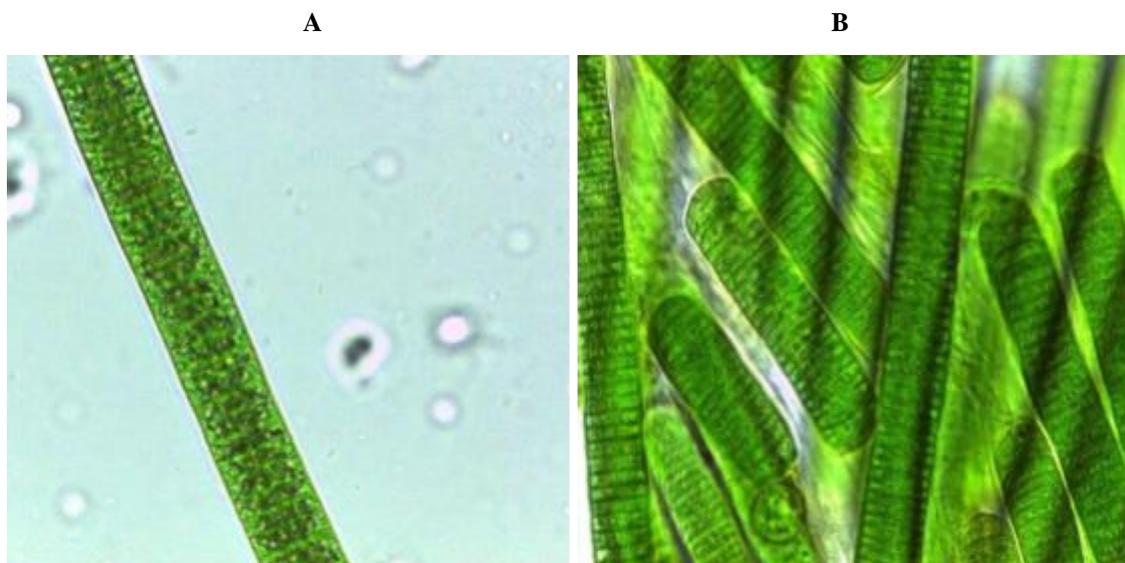
desenvolvimento de um organismo como os metabólitos primários, os metabólitos secundários desempenham outras funções que podem garantir a defesa e o sucesso de uma espécie em determinados habitats (DEMAIN, 2000). Outra substância produzida por cianobactérias são as cianotoxinas, que são liberadas em grandes quantidades quando o organismo se encontra em constante estresse físico, e como forma de evitar o estresse oxidativo, de proteger de predadores e de aumentar a sua chance por nutrientes, as cianobactérias liberam essas toxinas que acabam afetando a todos no meio ambiente (SCHUURMANS *et al*, 2016; JANSSEN, 2019).

O aumento da concentração de nutrientes em um ecossistema pode provocar um sério desequilíbrio ambiental, provocando um fenômeno chamado de eutrofização (SIQUEIRA; OLIVEIRA & FILHO, 2008). Esse fenômeno acontece devido ao despejo irregular de matéria orgânica em locais que as cianobactérias estão presentes, provocando o aumento de nutrientes como fósforo e nitrogênio e assim favorecendo a floração dessas, que formam diversas colônias na superfície da água que impossibilita a entrada de luz, provocando a morte de diversos organismos presentes nesse meio. A floração acelerada por meio do acúmulo de matéria orgânica gera um maior número de toxinas liberadas pelas cianobactérias, que prejudicam principalmente a saúde da água, do solo e de animais que vivem e consomem essa água, incluindo os humanos (LEAL & SOARES, 2004).

2.2 O gênero *Lyngbya*

Lyngbya é um gênero de cianobactérias pertencente à família Oscillatoriaceae, as espécies dessa família são filamentosas e esses filamentos são retos e não ramificados, levemente ondulados e poucas vezes enrolados (Fig. 1), a maioria das espécies é bentônica e geralmente formam grandes tapetes coriáceos em camadas de espessura variada. Os filamentos são cilíndricos e geralmente mais largos que 6 µm, as células são distintamente mais curtas do que largas (discóides) e as células apicais geralmente têm uma caliptra (parede externa espessa) (THACKER & PAUL, 2004).

Figura 1 – Fotomicrografia de um filamento isolado (A) e da cultura (B) de *Lyngbya* sp. CACIAM 07. Visualização em Microscópio óptico Leica DM500 sob aumento de 1000x. Fonte: o autor.



É evidente o crescimento e descobrimento de diversas espécies deste gênero, onde mais de 60 espécies diferentes já são catalogadas ao redor do mundo, muitas dessas são conhecidas por serem ótimas produtoras de compostos com fins biotecnológicos, como metabólitos secundários, proteínas, enzimas, peptídeos, e lipopeptídeos com atividades de interesse industrial. Por exemplo, no estudo de Zainuddin e colaboradores, de 2009, foram descobertos quatro tipos de peptídeos cíclicos com atividade antimicrobiana (Lyngbyazothrins A, B, C e D) isolados de uma espécie de *Lyngbya*, que podem futuramente compor um novo medicamento contra microrganismos.

As espécies mais importantes do gênero *Lyngbya* em termos de produção de metabólitos secundários são *L. majuscula*, *L. martensiana*, *L. aestuarii* e *L. wollei* (LIU & REIN, 2010). Em um estudo recente, de 2022, Satyabrata Dash e colaboradores investigaram duas dessas espécies mais importantes, *Lyngbya majuscula* e *Lyngbya martensiana*, ambas possuíram atividades antimicrobianas contra patógenos, atividade antioxidante e atividade citotóxica contra três linhagens diferentes de câncer.

Para compreender o amplo espectro da bioatividade desse gênero, a revisão de Diao T. A. Youssef (2022) catalogou compostos provenientes das cianobactérias do gênero *Lyngbya* e dos seus morfotipos, revisando a literatura desde 1979 até 2022, resultando em 72 metabólitos secundários que possuem atividade anti-infecciosa, inibindo bactérias, como das espécie *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*, fungos da espécies *Candida albicans* e *Candida glabrata* e parasitas, como os da espécie *Trypanosoma cruzi*.

2.3 Peptídeos antimicrobianos (AMPs)

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) são moléculas de baixo peso molecular produzidas por diversos organismos diferentes, incluindo bactérias, fungos, plantas e animais. Verificou-se que esses peptídeos têm atividade antimicrobiana de amplo espectro, o que significa que podem matar ou inibir o crescimento de uma ampla gama de microrganismos, incluindo bactérias, vírus, fungos e parasitas.

Os AMPs desempenham um papel importante na resposta imune inata de muitos organismos, já que evolutivamente foram tornando-se moléculas que garantem a sobrevivência do organismo, fornecendo uma primeira linha de defesa contra patógenos invasores. Os diferentes tipos de AMPs compartilham características semelhantes, sendo moléculas curtas e que tipicamente formam um aglomerado de aminoácidos hidrofóbicos e catiônicos, sendo assim anfipáticos, o que significa que possuem regiões hidrofóbicas e hidrofílicas. Essa estrutura permite que eles interajam e perturbem as membranas das células microbianas, causando lise e morte (ZASLOFF, 2002; AGEITOS *et al*, 2016).

Uma das vantagens dos AMPs sobre os antibióticos convencionais é sua atividade de amplo espectro, o que significa que são eficazes contra uma ampla gama de patógenos e possuem uma probabilidade menor de causar o desenvolvimento de resistência se comparado com os antibióticos comerciais, existem teorias de como esses peptídeos podem “driblar” a habilidade de resistências das bactérias, uma convincente seria porque os peptídeos antimicrobianos atacam a membrana diretamente, o microrganismo teria que redesenhar sua membrana, alterando a composição e/ou a organização dos seus lipídios, algo muito custoso para o microrganismo e talvez inviável (ZASLOFF, 2002).

Além disso, descobriu-se que muitos AMPs têm propriedades imunomoduladoras, o que significa que podem ajudar a regular a resposta imune e reduzir a inflamação. Os AMPs têm aplicações potenciais em vários campos, incluindo medicina, agricultura e preservação de alimentos. Eles têm sido estudados como possíveis tratamentos para infecções bacterianas, incluindo cepas resistentes a antibióticos (VAN HARTEN *et al*, 2018).

No entanto, apesar de promissor, ainda existem alguns desafios para o desenvolvimento e uso de AMPs. Um grande desafio é o alto custo de produção, que tem limitado seu uso comercial, além da preocupação com a degradação desses peptídeos por proteínases e peptidases presentes em fluidos biológicos. Também existem preocupações sobre seu potencial toxicidade e imunogenicidade, que precisam ser cuidadosamente avaliadas. Verónica Rojas e colaboradores (2020) citam formas de se evitar alguns desses

problemas, como por exemplo, a diminuição do custo pela implementação de estratégias de síntese mais eficientes e baratas e a manipulação da sequência do peptídeo, com o objetivo de evitar e prevenir contra a degradação, essa revisão também comenta formas de melhorar esses peptídeos para que futuramente seja viável a larga produção. Por causa do aumento da resistência bacteriana aos antibióticos comuns, há um interesse renovado na busca de novas moléculas que possuam atividade antimicrobiana.

2.4 Mecanismo de ação dos AMP e a sua biodisponibilidade

O mecanismo de ação dos AMPs é um dos fatores que sinalizam que o uso dessas moléculas, das mais diversas fontes, podem se tornar fármacos e que poderiam auxiliar ou substituir os antibióticos, Embora exista, sim, uma probabilidade de desenvolvimento de resistência aos peptídeos antimicrobianos (AMPs), em comparação com os antibióticos convencionais, os AMPs apresentam menor probabilidade de induzir resistência por parte das bactérias (HANCOCK & SAHL, 2006). Esses peptídeos podem interagir com a membrana das bactérias de diferentes formas, buscando romper a célula. Alguns mecanismos incluem a eletroporação, a despolarização da membrana não lítica e o direcionamento de lipídios oxidados. Essas são apenas algumas das estratégias utilizadas pelos peptídeos antimicrobianos para combater as bactérias. Esses mecanismos de formação de poros direcionados à membrana, tornam os AMPs inerentemente mais difíceis para os microrganismos contornarem desenvolvendo resistência (SANG, 2008).

2.5 Peptídeos antimicrobianos versus antibióticos

Desde antes da comercialização da penicilina (1940), os antibióticos já eram conhecidos como uma das salvasões da medicina, como o Salvarsan, um medicamento composto com arsênio que prometia uma atividade antiparasitária em meados dos anos de 1910. Após esta época, os estudos desses medicamentos se intensificaram, e após a primeira guerra mundial notou-se a importância de medicamentos que poderiam salvar soldados contra infecções (MOHR, 2016). Décadas se passaram e os antibióticos foram se tornando cada vez mais acessíveis e comercializados, vistos como a solução para as infecções bacterianas, porém devido a fatores como, a prescrição desnecessária de antibióticos para infecções virais, automedicação e o uso de antibióticos na pecuária foram aos poucos tornando as bactérias resistentes a esses medicamentos, gerando um uso cada vez maior desses antibióticos para combater a infecção e assim selecionado ainda mais a resistência pelas bactérias que sobreviveram (GUGGENBICHLER, 2022).

Os antibióticos são um dos pilares da medicina e a salvação de milhões de pessoas ao redor do mundo, mas o uso inapropriado e como consequência a geração da resistência pelas

bactérias causou uma crise na medicina moderna que vem cada vez mais impulsionando os estudos de novas moléculas, para a fabricação de novos fármacos que possam substituir o uso de antibióticos (WRIGHT, 2015). Em 2017, Cassandra Willyard, descreveu que a cada ano mais de 700.000 mil pessoas morrem ao redor do mundo devido à resistência a antibióticos e informa que se a crise não for solucionada, especialistas preveem que até o ano de 2050 esse número pode chegar até 10 milhões. Somente nos Estados Unidos e Europa, nos anos de 2017 e 2018 o número de mortes por essa causa foi de mais de 23 e 25 mil pessoas por ano, respectivamente (GROSS, 2013).

A revisão de Rima e colaboradores, de 2021, sinaliza diversas vantagens dos AMPs em relação aos antibióticos clássicos, como os mecanismos de resistência comuns observados em relação aos antibióticos convencionais são evitados pelos AMPs, principalmente pelo uso de diferentes mecanismos por um peptídeo. São mais fáceis de sintetizar, pois geralmente consistem em sequências curtas de aminoácidos, além de apresentarem ação rápida. E estudos indicam que não afetam a microbiota, que muitas vezes é perturbada pelos antibióticos convencionais.

Maria Magana e colaboradores (2020), demonstraram o porquê que os peptídeos antimicrobianos podem ser uma das soluções para a crise dos antibióticos. Neste estudo foram apresentados fatores, como o mecanismo de ação dos AMPs, que sinalizam que o uso de AMPs, das mais diversas fontes, podem se tornar fármacos que substituiriam os antibióticos e teriam menos probabilidades de causar uma resistência por parte das bactérias, mesmo já ocorrendo casos de resistência por parte das bactérias. Esses peptídeos podem interagir de diferentes formas com a membrana das bactérias com o objetivo de romper a célula, como por exemplo, eletroporação, despolarização de membrana não lítica, direcionamento de lipídios oxidados, entre outros. Esses mecanismos de formação de poros direcionados à membrana tornam os AMPs inerentemente mais difícil para os microrganismos contornarem, desenvolvendo resistência (SANG & BLECHA, 2008)

Embora a crescente resistência aos antibióticos comerciais tenha impulsionado o interesse por peptídeos antimicrobianos (AMPs), devido à sua menor probabilidade de induzir resistência, a eficácia clínica desses compostos é frequentemente limitada pela baixa biodisponibilidade. Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) são compostos geralmente catiônicos e anfipáticos, com forte afinidade por membranas bacterianas. Contudo, essas mesmas características favorecem sua degradação por proteases e sua interação não específica com componentes do hospedeiro. Embora essa interação contribua para sua atividade de amplo espectro, também representa um ponto negativo, pois prejudica sua distribuição e eficácia in vivo (MA et al., 2024).

A biodisponibilidade oral é especialmente baixa, dada a degradação no trato gastrointestinal, pH ácido do estômago, barreiras de absorção intestinal e a quantidade de proteases presentes (DESHAYES et al., 2022). Para superar essas limitações, diversas abordagens vêm sendo propostas. Uma delas envolve a entrega do AMP por meio de fixação na superfície de diferentes materiais como nanopartículas, lipossomas, e materiais mesoporosos, que podem encapsular os AMPs e protegê-los da degradação enzimática, além de melhorar sua permeabilidade intestinal. Além de outras metodologias como uma nova formulação de AMP por meio de automontagem e entrega direcionada (WANG et al., 2021)

2.6 Compostos alelopáticos das cianobactérias

O termo alelopatia foi criado pelo botânico Hans Molisch, em 1937, e entendeu-se como uma influência direta que uma planta pode causar na outra, através da liberação de compostos químicos no meio ambiente, que na maioria das vezes tem como objetivo inibir ou matar outra planta (EMBRAPA, cap. 1). Mas não somente as plantas utilizam da alelopatia, os microrganismos também são conhecidos por utilizarem compostos e substâncias químicas para afetar outros microrganismos. Essas moléculas, chamadas de aleloquímicos, são na sua maioria metabólitos secundários que tem como objetivo garantir a sobrevivência e proteção do organismo produtor, afetando o meio ambiente em que se encontra (FERREIRA & AQUILA, 1999). Segundo Pires e Oliveira (2011), a natureza química dessas moléculas é bem diversa, encontrando-se uma grande diversidade na literatura, desde hidrocarbonetos, como o etileno, até compostos complexos, como os policíclicos.

Os aleloquímicos, além de possuírem uma diversidade em relação às suas composições, também possuem uma ampla gama de habilidades, causando diversos efeitos, como inibir o crescimento, paralisar os músculos, inibir o metabolismo e até levar à morte, e os organismos alvos diferem entre si, desde invertebrados, mamíferos, microalgas e microrganismos (LEFLAIVE & TEN-HAGE, 2006). Diversas espécies de cianobactérias são produtoras de compostos com atividade alelopática, e aquelas que tem potencial e inibir ou matar outras cianobactérias e microalgas possuem um grande potencial biotecnológico, já que são algicidas naturais e assim são mais sustentáveis do que os comerciais.

O crescimento acelerado das cianobactérias e microalgas pode causar um grande desequilíbrio ambiental, e a forma mais usual de controlar esse problema é a utilização de algicidas químicos, que prometem a remoção das florações nas águas. Porém, esses produtos além de serem tóxicos para outros organismos aquáticos, como plantas e microrganismos, estes podem se acumular no sedimento em concentrações prejudiciais e podem causar uma desregulação no meio em que foi utilizado. Além de que, esses produtos têm como mecanismo de ação a lise celular das cianobactérias e microalgas, e ao ocorrer esse

rompimento celular, as cianotoxinas são liberadas no meio ambiente, piorando a situação (GUMBO *et al*, 2008). A utilização de aleloquímicos produzidos pelas próprias cianobactérias, ou por bactérias, é visto como uma solução para esse problema.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Obtenção e caracterização do peptídeo antimicrobiano da cianobactéria *Lyngbya* sp. CACIAM 07.

3.2 Objetivo Específicos

- i. Selecionar o meio de cultura ideal para o crescimento da *Lyngbya* sp. CACIAM 07;
- ii. Obter o extrato bruto da *Lyngbya* sp. CACIAM 07;
- iii. Purificar e fracionar do extrato bruto por cromatografia líquida;
- iv. Avaliar espectro de ação da atividade antimicrobiana, do extrato e das suas frações, frente a diferentes espécies de bactérias e leveduras;
- v. Detectar atividade alelopática da biomassa e extrato bruto da *Lyngbya* sp. CACIAM 07;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Seleção do meio de cultura

Foram testados três tipos de meio de cultura para o crescimento da cianobactéria. Os meios preparados foram os seguintes: ASM-1 (tab. 1), CHU-10 (tab. 2) e Bg-11 (tab. 3). O ensaio foi conduzido em triplicata para diminuir o erro entre as culturas.

Meio ASM-1

Tabela 1 - Composição do meio ASM-1 (GORHAM *et al*, 1964 e ZAGATTO & ARAGÃO 1992).

| Estoque | Nutriente | Concentração (g/L) | Volume (para 1L) | Concentração final (g/L) |
|---------|---|--------------------|------------------|--------------------------|
| A | NaNO ₃ | 8,5 | 20 mL | 0,17 |
| | MgSO ₄ .7 H ₂ O | 2,45 | | 0,049 |
| | MgCl ₂ .6 H ₂ O | 2,05 | | 0,041 |
| | CaCl ₂ .2 H ₂ O | 1,45 | | 0,029 |
| B | KH ₂ PO ₄ | 8,7 | 2 mL | 0,0174 |
| | Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ O | 17,8 | | 0,0356 |
| C | H ₃ BO ₄ | 24,8 | 0,1mL | 0,00248 |
| | MnCl ₂ .4 H ₂ O | 13,9 | | 0,00139 |
| | FeCl ₃ .6 H ₂ O | 9,018 | | 0,0009018 |
| | ZnCl ₂ | 3,35 | | 0,000335 |
| | CoCl ₂ .6 H ₂ O | 0,19 | | 0,000019 |
| | CuCl ₂ .2 H ₂ O | 0,0013 | | 0,0000013 |
| D | EDTA | 18,6 | 0,4mL | 0,00744 |

Meio CHU N°10

Tabela 2 - Composição do meio CHU-10. *Composição Micronutrientes na tabela 4

| Nutriente | Estoque (para 1 L) | Concentração Final (g/L) |
|---|-----------------------|-----------------------------|
| Ca(NO ₃) ₂ .4 H ₂ O | 50 mL | 0,05 |
| MgSO ₄ .7 H ₂ O | 25 mL | 0,025 |
| K ₂ HPO ₄ | 13 mL | 0,013 |
| Na ₂ CO ₃ | 20 mL | 0,02 |
| Ácido cítrico | 3 mL | 0,003 |
| Citrato férrico ou FeCl ₃ | 3 mL | 0,003 |
| *Micronutrientes | 1 mL | 1 mL |

Meio BG-11

Tabela 3 - Composição do meio BG-11 (RIPPKA *et al*, 1979)

| Componente | Estoque (g/L) | Volume (para 1L) | Concentração Final (g/L) |
|---------------------------------------|------------------|------------------|-----------------------------|
| NaNO ₃ | 150 | 10 mL | 1,5 |
| K ₂ HPO ₄ | 40 | 1 mL | 0,004 |
| MgSO ₄ .7 H ₂ O | 75 | 1 mL | 0,075 |
| CaCl ₂ .2 H ₂ O | 36 | 1 mL | 0,036 |
| Ácido cítrico | 6 | 1 mL | 0,006 |
| Citrato de amônio férrico | 6 | 1 mL | 0,006 |
| Na ₂ EDTA | 1 | 1 | 0,001 |
| *Micronutrientes | - | 1 | - |
| Carbonato de sódio | 20 | 1 | 0,02 |

*Solução de Micronutrientes

Tabela 4 - Solução de micronutrientes do meio BG-11 e CHU-10 (RIPPKA *et al*, 1979)

| Componente | g/L |
|--|-------|
| H ₃ BO ₃ | 2,86 |
| MnCl ₄ .4 H ₂ O | 1,81 |
| ZnSO ₄ .7 H ₂ O | 0,222 |
| Na ₂ MoO ₄ .2 H ₂ O | 0,39 |

| | |
|---|-------|
| CuSO ₄ .5 H ₂ O | 0,079 |
| Co(NO ₃) ₂ .6 H ₂ O | 0,049 |

4.2 Cultivo

4.2.1 Cianobactérias

As réplicas das culturas das cianobactérias do banco CACIAM, que foram utilizadas neste trabalho, são mantidas em cultivo no Laboratório de Biotecnologia de Enzimas de Biotransformações (LaBEB) - ICB (UFPA). As amostras para os ensaios foram inoculadas, a partir da réplica, em erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL do meio de cultura. Após o cultivo de 30 dias, as cianobactérias foram inoculadas em erlenmeyers de 2 L, contendo 1 L do meio de cultura, por 60 dias à temperatura ambiente (25°) e sob exposição de luz artificial em um fotoperíodo de 12/12 h claro/escuro. A cianobactéria *Lyngbya* sp. CACIAM 07 foi o alvo de estudo para produção de moléculas antimicrobianas e compostos alelopáticos, enquanto as demais cianobactérias serviram de reveladoras (alvo) para avaliar a atividade inibitória da CACIAM 07 (Tab. 5).

Tabela 5: Relação das cianobactérias e sua função no ensaios de alelopatia e antimicrobiano

| Espécie da cianobactéria | Função | Ponto de coleta |
|---|------------|---|
| <i>Lyngbya</i> sp. CACIAM 07 | Produtora | Reservatório da hidrelétrica de Tucuruí |
| <i>Microcystis aeruginosa</i> CACIAM 03 | Reveladora | Reservatório da hidrelétrica de Tucuruí |
| <i>Cyanobium</i> sp. CACIAM 14 | Reveladora | Reservatório da hidrelétrica de Tucuruí |
| <i>Synechococcus</i> sp. CACIAM 66 | Reveladora | Reservatório da hidrelétrica de Tucuruí |

4.2.2 Bactérias reveladoras

O meio de cultura utilizado foi o LB (Luria Bertani), o meio padrão para testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos é o Mueller Hinton (NCCLS, 2005), mas por falta deste no laboratório, testou-se com LB. Primeiro preparamos um inóculo da bactéria em meio líquido, incubado a 37°C sob agitação, por 48 horas. Após esse período as bactérias foram inoculadas em placas com meio sólido (Ágar 1,5%), para o teste de atividade antimicrobiana. Todas as linhagens de bactérias utilizadas nesse trabalho pertencem ao Laboratório de Biotecnologia de Enzimas e Biotransformações (ICB/UFPA). As bactérias de revelação estão elencadas na tabela 6.

Tabela 6 - Bactérias reveladoras selecionadas para os ensaios e suas respectivas caracterizações.

| Microrganismos (Bactérias) | Caracterização |
|--|-----------------------|
| <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 | Gram-positiva |
| <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 6477 | Gram-positiva |
| <i>Corynebacterium fimi</i> NTC 5 | Gram-positiva |
| <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14021 | Gram-negativa |

4.2.3 Leveduras reveladoras

O meio de cultura que foi utilizado para as leveduras é o Sabouraud Dextrose. Foram preparados pré-inóculos para cada levedura, e depois incubados a 30°C sob agitação, por 48 horas. Após esse período foi realizado o inóculo em placas com meio sólido Sabouraud Dextrose (Agar 2%), para o teste de atividade antimicrobiana. Todas as linhagens de leveduras utilizadas neste trabalho pertencem ao Laboratório de Biotecnologia de Enzimas e Biotransformações (ICB/UFPA). As leveduras de revelação utilizadas foram *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis*.

4.3 Otimização do meio de cultura

Com o objetivo de avaliar a produção de biomassa das cianobactérias sobre diferentes condições. Foram realizados dois testes, o primeiro consistia em submeter a cultura da CACIAM 07 a aeração constante, durante os 30 dias de crescimento. A aeração controlada é uma das maneiras de garantir que todas as células da cianobactéria recebam a mesma

quantidade de nutrientes, sem causar tantos danos, como na agitação (ORLANDO *et al.*, 2018).

No segundo teste, foi adicionado 1,5% de hidrolisado de cupuaçu e 1 ml de fosfato de potássio em três meios de cultura para a *Lyngbya* sp. CACIAM 07 e avaliou-se o crescimento e a aparência da cultura depois de 7, 20 e 30 dias. A adição de um hidrolisado e o fosfato tem como objetivo aumentar a produção da biomassa em menos tempo.

4.4 Extração

Após a fase de cultivo, a biomassa úmida da cianobactéria deve ser recolhida. As culturas de cianobactérias devem ser liofilizadas e depois ressuspensas até cobrir toda a biomassa no solvente escolhido, que será a água ultrapura. Depois, é necessário que as amostras passem pelo processo de rompimento celular, através do método de sonicação (5 ciclos, 30 s, 60% potência) e depois centrifugadas (10.000 x g por 10 minutos) e filtradas. O produto desse processo é então chamado de extrato bruto.

4.5 Atividade antimicrobiana do extrato bruto e frações

O teste de difusão por poço foi realizado conforme o “Manual Clinical and Laboratory Standards Institute”, e foram feitos 4 poços de 6,0 milímetros de diâmetro em cada placa com meio sólido LB (Ágar 1,5%) para bactéria e Sabouraud Dextrose (Ágar 1,5%) para leveduras. Primeiramente foi feito o pré-inóculo do microrganismo revelador, os de bactérias foram incubados à 37°C por 24 horas e os de leveduras à 30°C por 48 horas. Após esse período, foi feita a leitura da absorbância dos inóculos para se ter uma padronização da concentração de microrganismo que seria inoculado na placa. O inóculo foi despejado na placa e espalhado com auxílio da alça tipo Drigalski (formato em L) e os poços preenchidos com 50 µL das amostras. Em todos os testes as placas de bactérias foram incubadas à 37°C por 24 horas e as placas de leveduras à 30°C por 48 horas. Foi utilizado um paquímetro digital para mensurar, em milímetros, os halos de inibição.

4.6 Atividade alelopática da cianobactéria e do extrato bruto

Esse ensaio tem como objeto aferir se a biomassa ou extrato, de uma cianobactéria, consegue inibir o crescimento de outra cianobactéria e segue o protocolo de Javier Paz-Yepes e colaboradores, de 2013. Primeiro preparamos a cultura alvo (reveladora) e mensuramos o crescimento da cianobactéria através da leitura da absorbância, padronizamos uma absorbância igual a 0.6 na placa, para todas as cianobactérias reveladoras (CACIAM 03;

CACIAM 14 e CACIAM 66). Depois de realizar o cálculo de concentração de inóculo, adicionou-se a quantidade certa do pré inóculo para o inóculo de cada cultura. Depois da centrifugação (10.000 x g por 10 minutos), o pellet correspondente ao mL de cultura é misturado com 30 mL meio BG11-Agar (1.5%) a uma temperatura máxima de 50 °C, então foi plaqueado e levado para crescer a 25 °C por 24 h com fotoperíodo de 12h de claro e 12h de escuro.

A preparação da cultura produtora (atacante) começa com a homogeneização da mesma e depois uma centrifugação (10.000 x g por 10 minutos). O sobrenadante é descartado, e o pellet é misturado em meio BG-11 com 0,4% de Ágar (Para não secar a biomassa muito rápido) e posteriormente transferiu-se 150 µL dessa mistura para cada poço da placa. O extrato bruto da *Lyngbya sp.* CACIAM 07 foi testado, e as frações do extrato pós cromatografia também. Os resultados normalmente aparecem entre o 10º e o 15º dia.

4.7 Microdiluição em placa

Esse teste tem por objetivo encontrar a concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos e frações da CACIAM 07. Foram preparadas 3 placas de petri, inoculadas com a bactéria *Bacillus subtilis* e divididas em 4 quadrantes com um poço em cada. Foram utilizados 12 tubos de ensaio para a diluição seriada, em que o primeiro (1) possuía 50 µL do extrato bruto (sem diluição), no tubo de número 2, primeira diluição, foi adicionado metade do volume do tubo 1 e adicionado de 25 µL do tampão Tris-HCl pH 7,0 1 M, posteriormente, no tubo de número 3 foi adicionado metade do volume tubo 2 e adicionado de 25 µL do tampão Tris-HCl pH 7,0 1 M, seguindo a diluição neste mesmo padrão até chegar ao tubo de número

12. Por fim, cada amostra, dos tubos de 1 a 12, foram adicionadas aos poços das placas e os halos de inibição foram medidos em milímetros, utilizando um paquímetro digital.

4.8 Cromatografia de exclusão molecular

Para a purificação parcial foi utilizado 2 mL do extrato aquoso concentrado da CACIAM 07 em um cromatógrafo ÄKTA pure™. A amostra foi submetida a uma coluna de gel filtração HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 HR, já equilibrada com o tampão Tris-HCl pH 7,0 0,1M contendo 100 mM de NaCl, em que foram coletadas frações de 2 mL, em temperatura ambiente, e todas essas foram submetidas ao teste de atividade antimicrobiana.

4.9 Cromatografia de fase reversa

Para prever o comportamento da amostra frente aos solventes utilizados durante a cromatografia de fase reversa, primeiro certificou-se se a amostra suporta os solventes. Então, foi retirado 900 μL da amostra, que foram divididos em três diferentes tubos tipo eppendorfs, as amostras tiveram o volume reduzido, em *speed vacuum*, até 100 μL em cada recipiente, onde foi adicionado as seguintes soluções:

- 1) 1 ml de água ultrapura (no tubo controle).
- 2) 1 ml de água ultrapura + 10 μL de TFA 5% (Ácido trifluoroacético) (no tubo teste 1).
- 3) 1 ml de ACN (Acetonitrila) + 10 μL de TFA 5% (no tubo teste 1).

O conteúdo de cada eppendorf foi testado contra a bactéria *Bacillus subtilis* ATCC 6633, com o objetivo de avaliar se essas soluções interferiram na atividade inibitória da amostra. A amostra foi submetida a uma coluna de Resource RPC, no ÄKTA pure™, já equilibrada com as soluções, depois foram coletadas frações de 2 ml e todas essas foram submetidas ao teste de atividade antimicrobiana e alelopática.

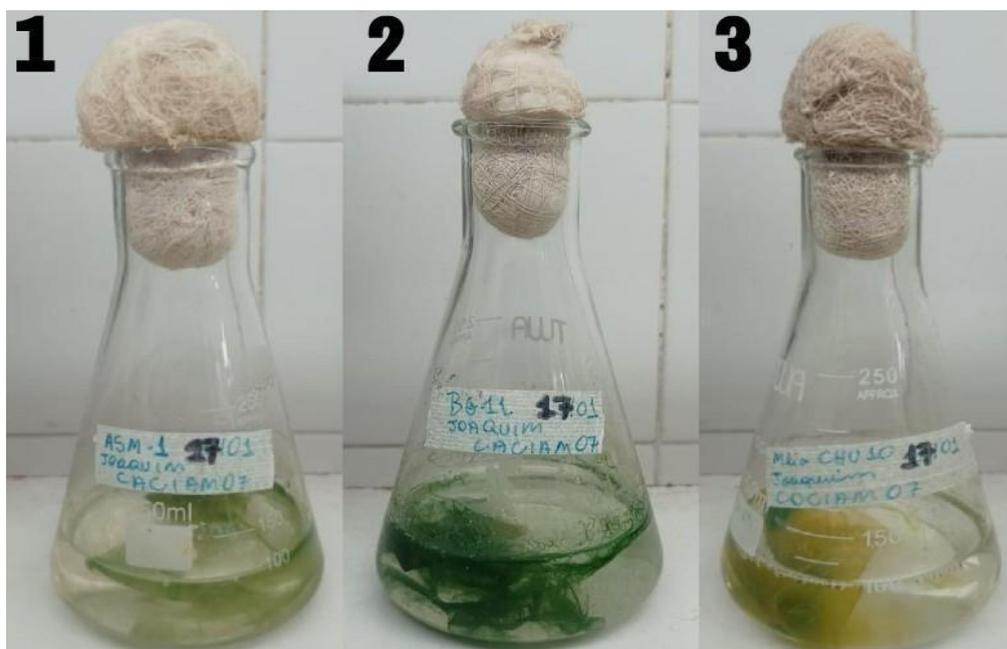
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Seleção do meio de cultura

Depois de 30 dias de crescimento, a biomassa foi coletada, liofilizada e pesada (Figura 2). A cianobactéria *Lyngbya* sp. CACIAM 07 teve um crescimento maior no meio BG-11, apresentando maior valor de biomassa em comparação com os outros meios, ASM e CHU-10 (biomassa). Após 30 dias de crescimento foi observado alterações no aspecto visual das culturas, como o amarelecimento da cultura e presença de precipitado, indicando o envelhecimento e morte das culturas nos meios ASM e CHU- 10, entretanto no cultivo em meio BG-11 observou-se a manutenção da cor e da biomassa (Fig. 2). O meio BG-11 é o mais comumente empregado para o crescimento de cianobactérias, por possuir uma equilibrada concentração de nutrientes e ser rico em fosfato e nitrogênio, dois dos nutrientes principais para o crescimento desses microrganismos (PANDEY *et al*, 2023).

Os outros dois meios de cultura utilizados, que são pobres em alguns nutrientes, têm como um dos objetivos levar o organismo ao estresse por falta de nutrientes, e assim pode-se analisar o crescimento e quantidade da produção de biomoléculas sobre esse efeito. Ao causar estresse no microrganismo, é possível que esse seja estimulado a produzir moléculas de defesa que auxiliem na sobrevivência, liberando essas moléculas no meio de cultura (KULTSCHAR & LLEWELLYN, 2018, REZAYIAN *et al*, 2019). Todos os meios de cultura foram testados em relação a sua possível atividade antimicrobiana, e todos tiveram resultados negativos perante as bactérias e leveduras reveladoras utilizadas nesse estudo.

Figura 2 - Culturas da *Lyngbya* sp. CACIAM 07 em diferentes meios de cultura. (1) ASM-1. (2) BG-11. (3) CHU-10. Fonte: Autor.



5.2 Aeração constante da cultura

A *Lyngbya* sp. CACIAM 07 por ser uma cianobactéria filamentosa e bentônica, acaba agrupando os seus filamentos em grumos e se aderindo nas superfícies da vidraria. A aeração permitiu que esses filamentos não se conectassem e nem aderissem na vidraria, homogeneizando o meio de cultura e facilitando o repique dessa cultura (Fig. 3.1). Porém, depois de 20 dias as culturas demonstraram uma coloração amarelada da biomassa, sinalizando a morte celular daquela cianobactéria, enquanto o controle sem aeração continuou com uma aparência saudável. No momento da coleta da biomassa, o meio de cultura apresentou um aspecto muito turvo e amarelado (Fig. 3.2), e foi reservado e posteriormente testado para o ensaio de atividade antimicrobiana.

Figura 3 - (1) Culturas sob aeração constante. (2) Biomassa coletada e o meio de cultura. Fonte: Autor



O processo de obtenção do extrato foi realizado e tanto o meio de cultura quanto o extrato bruto deram negativo quando testados frente a bactérias e leveduras reveladoras, e a cultura controle (sem aeração) positivou para *Bacillus subtilis* ATCC 6633 e *Salmonella typhimurium* ATCC 14021.

Quanto à quantidade de biomassa produzida, após 30 dias de crescimento as três culturas foram liofilizadas e pesadas (Tab. 7). A aeração não beneficiou em nenhum quesito o crescimento da *lyngbya* sp. CACIAM 07, já que não aumentou a quantidade de biomassa, causou a morte celular mais rapidamente e possivelmente inibiu a atividade bioativa da cianobactéria.

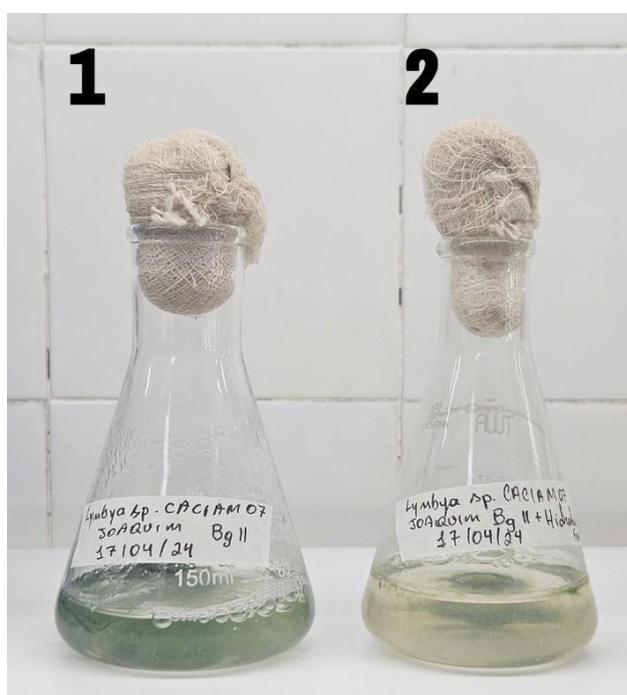
Tabela 7. Peso da biomassa liofilizada da *Lyngbya* sp. CACIAM 07 em diferentes condições.

| Organismo | Condição | Peso (g) |
|------------------------------|-------------------------|----------|
| <i>Lyngbya</i> sp. CACIAM 07 | Com aeração (duplicata) | 0,399 |
| | Sem aeração (controle) | 0,661 |

5.3 Adição do hidrolisado de cupuaçu e fosfato de potássio

Com o objetivo de otimizar o meio de cultura e testar se a cianobactéria *Lyngbya* sp. CACIAM 07 produziria mais biomassa, foi adicionado novas fontes de nutrientes, o hidrolisado de cupuaçu e fosfato de potássio em três culturas (Fig 4). O resultado foi negativo, já que a quantidade de biomassa permaneceu praticamente a mesma, não apresentando diferença significativa.

Figura 4. (1) Cultura somente com o meio Bg-11. (2) Cultura com meio Bg-11 mais hidrolisado de cupuaçu e fosfato de potássio.



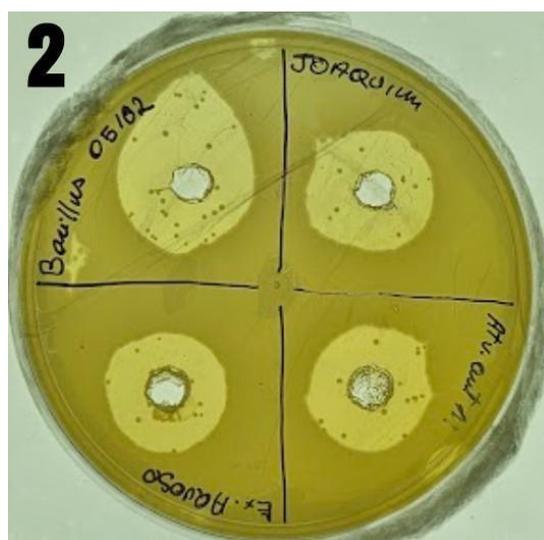
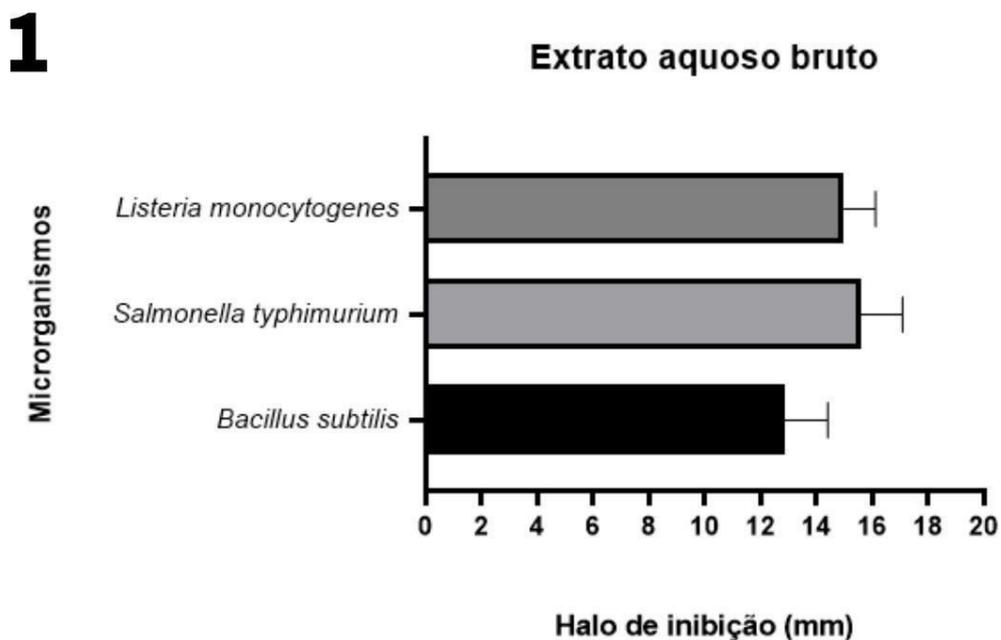
5.4 Escolha do extrato

Uma das dificuldades na extração de uma substância desconhecida é selecionar o solvente de extração mais apropriado sem conhecer as características do composto, como polaridade. Como as substâncias a serem extraídas são incertas, diferentes soluções de extração devem ser empregadas no começo, e a atividade antibacteriana deve ser avaliada e comparada (STRIETH *et al*, 2022).

Foram realizadas três extrações com diferentes solventes: água ultrapura, metanol (70%) e clorofórmio (90%) e para todos os ensaios de atividade antimicrobiana deste trabalho, a bactéria reveladora *Bacillus subtilis* foi utilizada como padrão de teste, seguindo o

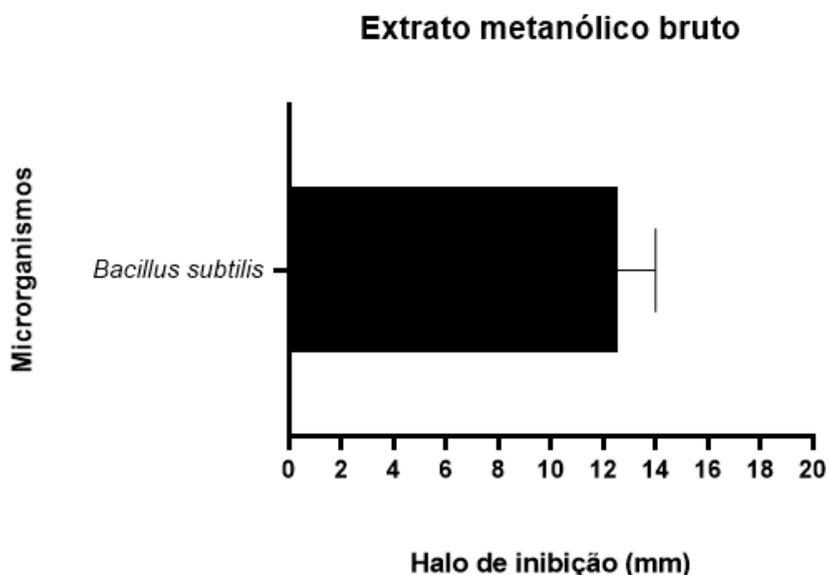
CLSI (2020). O primeiro ensaio de atividade utilizou o extrato aquoso bruto e ao obter resultado contra a *Bacillus subtilis* ATCC 6633, testou-se o mesmo extrato contra as outras bactérias reveladoras (*Salmonella typhimurium* ATCC 14021, *Corynebacterium fimi* NTC 5 e *Listeria monocytogenes* ATCC 6477), o resultado pode ser visualizado na figura 5. Seguiu-se o mesmo protocolo para os outros extratos.

Figura 5. (1) Atividade antimicrobiana do extrato aquoso bruto frente às bactérias reveladoras (2) Halos de inibição das frações do extrato aquoso bruto frente a bactéria *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Fonte: Autor.



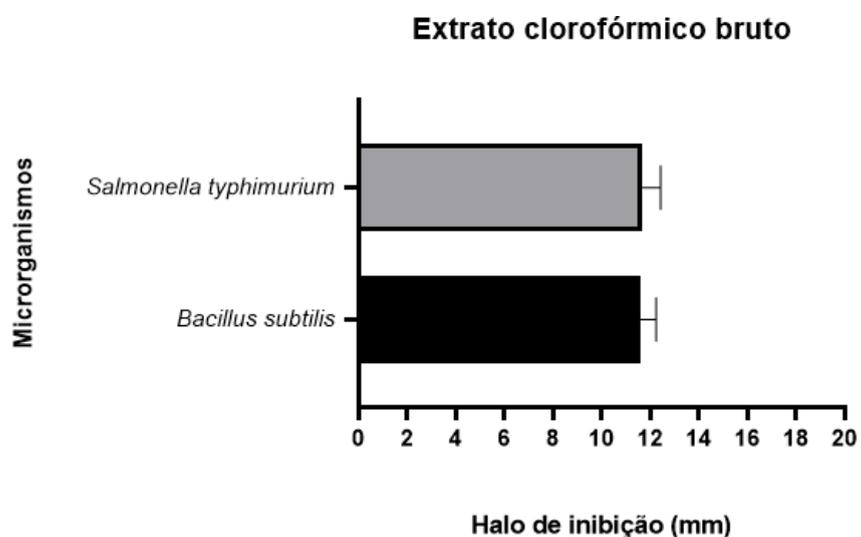
O extrato metanólico bruto foi testado contra as mesmas bactérias reveladoras, porém, só houve resultado positivo contra a *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (12,35 mm) (Fig. 6).

Figura 6. Atividade antimicrobiana do extrato metanólico bruto frente às bactérias reveladoras.



O extrato clorofórmico bruto também foi testado contra as mesmas bactérias reveladoras, e inibiu o crescimento da *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (Fig. 7).

Figura 7. Atividade antimicrobiana do extrato clorofórmico bruto frente às bactérias reveladoras.

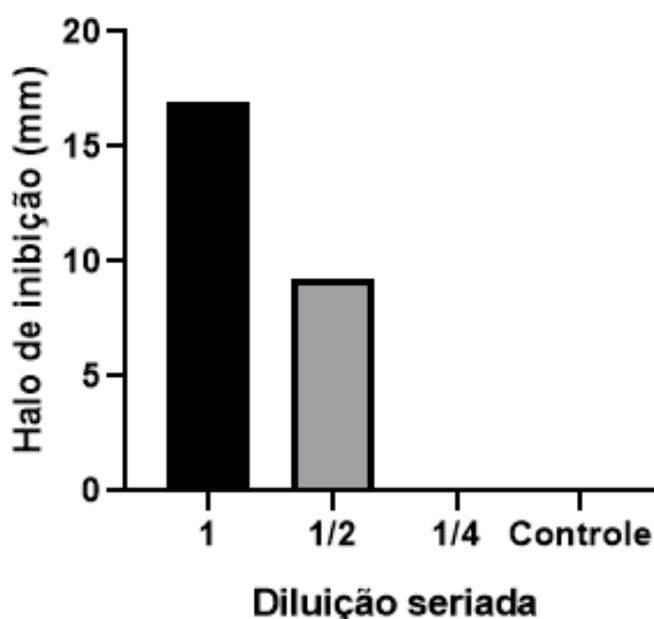


O extrato aquoso bruto foi o que teve os melhores resultados, além de possuir um espectro maior de inibição, inibindo três das quatro bactérias reveladoras utilizadas, o que podemos inferir que a molécula alvo que estamos analisando é polar e possui uma afinidade maior pela água como solvente. Então, o extrato aquoso bruto foi selecionado como melhor opção para continuar os testes.

5.5 Microdiluição em placa

O resultado foi que a partir da segunda diluição (1/2 do extrato) não houve mais halo, ou seja, a atividade da molécula não foi efetiva o suficiente para inibir o crescimento da bactéria ao seu redor. Na figura 8 temos os valores de mensuração dos halos de inibição, em que duas diluições apresentaram atividade, a atividade foi diminuindo em cada diluição até que a partir da segunda diluição seriada (1/2) a amostra perde a sua atividade. A concentração inibitória mínima do extrato da *Lyngbya* sp. CACIAM 07 é de 25 µL de amostra diluída, ou seja 1/2 de diluição.

Figura 8: Halos de inibição frente a bactéria *Bacillus subtilis* no ensaio de atividade antimicrobiana em placa, com diluição do extrato aquoso bruto .



5.6 Cromatografia de exclusão molecular e atividade antibacteriana das frações

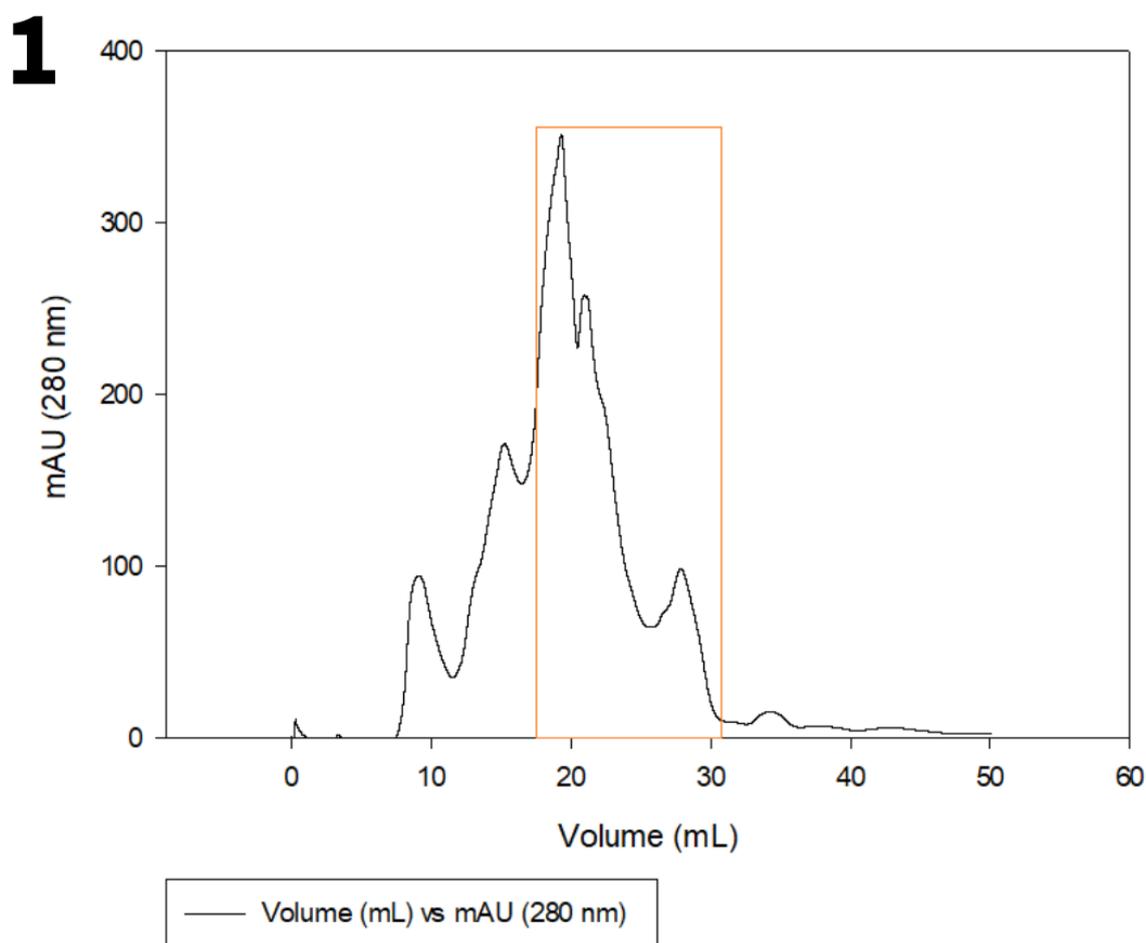
A cromatografia de exclusão molecular é uma técnica importante para separação de proteínas de acordo com diferenças de tamanho, e segundo a fabricante a coluna HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 HR, essa foi projetada para separar peptídeos e proteínas pequenas (proteínas globulares da faixa de fracionamento 1×10^3 – 1×10^5).

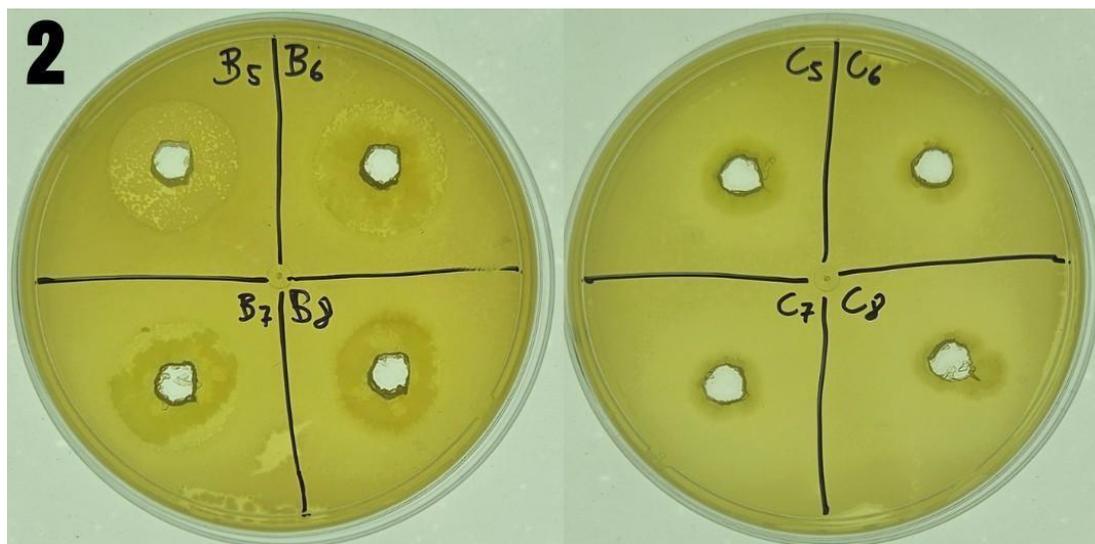
O extrato aquoso bruto foi selecionado para a purificação. As frações foram coletadas e todas foram testadas contra a bactéria *Bacillus subtilis* ATCC 6633, após 24 horas dentro da estufa à 37 C° as placas foram retiradas e os halos foram mensurados. Todas as frações eluídas nos volumes de 19 a 31 apresentaram atividade (Fig.9), então todas estas frações

foram reunidas e depois, foram concentradas por 6 horas, em concentrador a vácuo (*speedvaccum*), até chegar ao volume de 500 μ L.

Na revisão de Strieth e colaboradores, de 2022, os autores discutem os compostos com atividade antimicrobiana de diversas espécies de cianobactérias, e destacam que a maioria desses compostos foi extraída utilizando um solvente químico, principalmente o metanol, etanol e o diclorometano. Esse foi um dos motivos por selecionarmos a água ultrapura como nosso solvente, já que queríamos encontrar uma molécula com uma afinidade maior com este solvente, que possa passar despercebida em outros trabalhos.

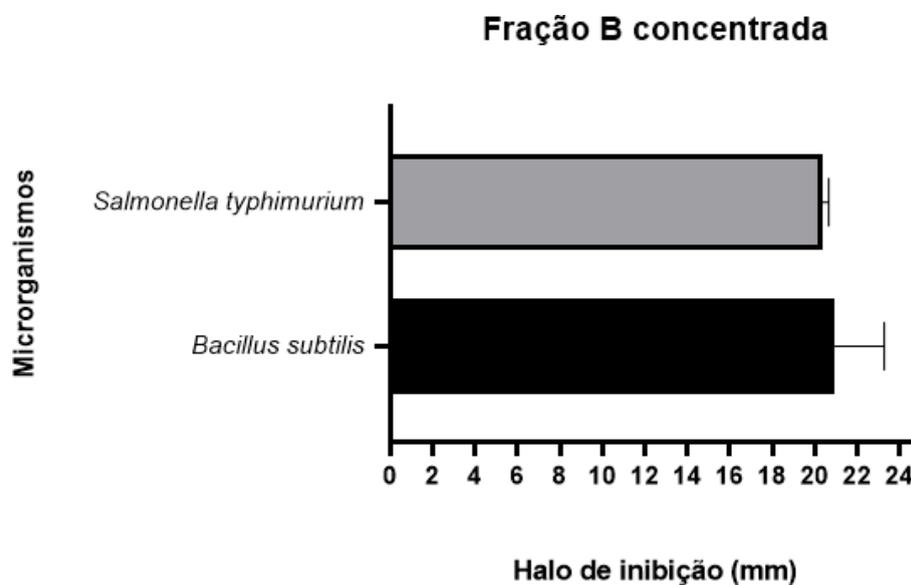
Figura 9: Cromatograma de exclusão molecular em coluna Superose 12 (1) e halos de inibição (2) das frações do extrato aquoso bruto frente a bactéria *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Em destaque, dentro do quadrado laranja, as frações que apresentaram atividade antimicrobiana. Linha preta – 280 nm. Fonte: Autor.





As frações concentradas foram testadas novamente contra todas as bactérias reveladoras. O resultado pode ser visualizado na figura 10, em que somente a fração B concentrada mostrou atividade inibitória frente duas bactérias reveladoras, a *Bacillus subtilis* ATCC 6633 e *Salmonella typhimurium* ATCC 14021.

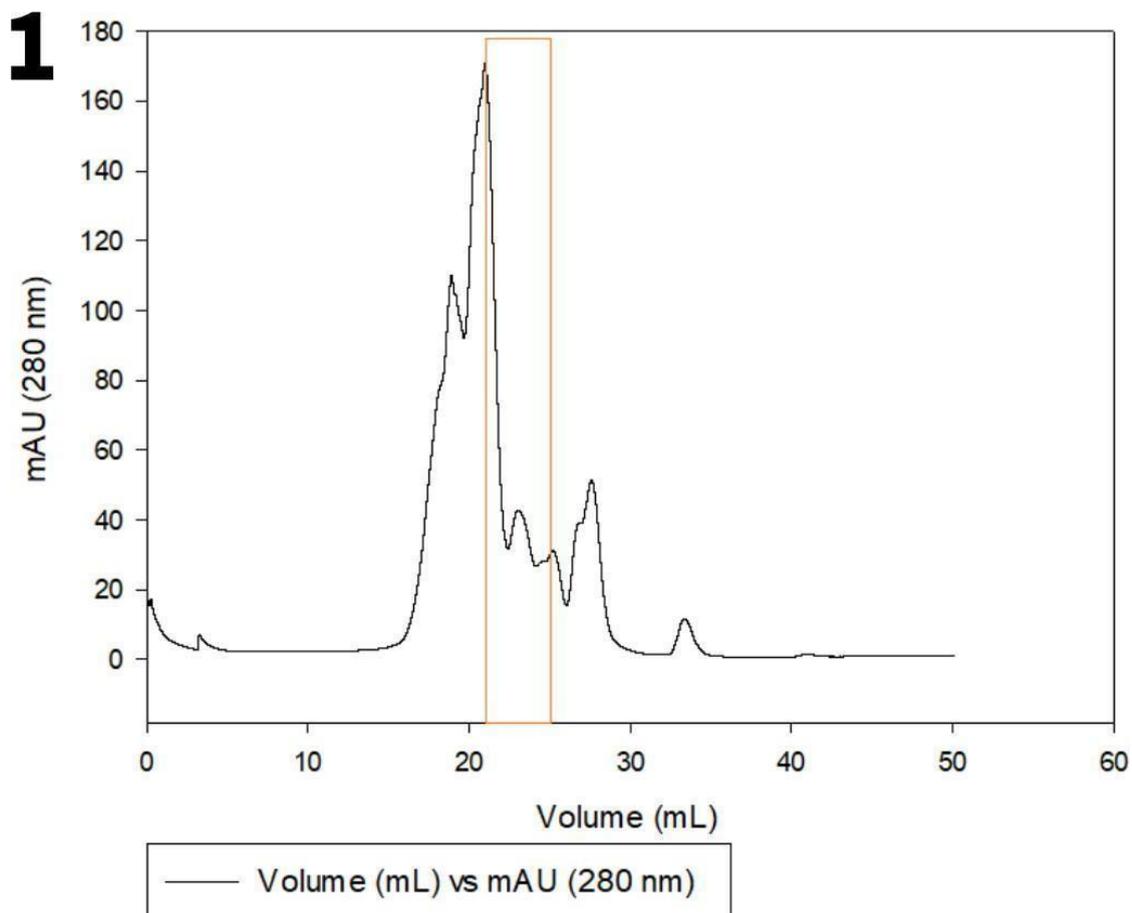
Figura 10: Mensuração dos halos de inibição das frações reunidas e concentrada, frente as bactérias *Bacillus subtilis* ATCC 6633 e *Salmonella typhimurium* ATCC 14021

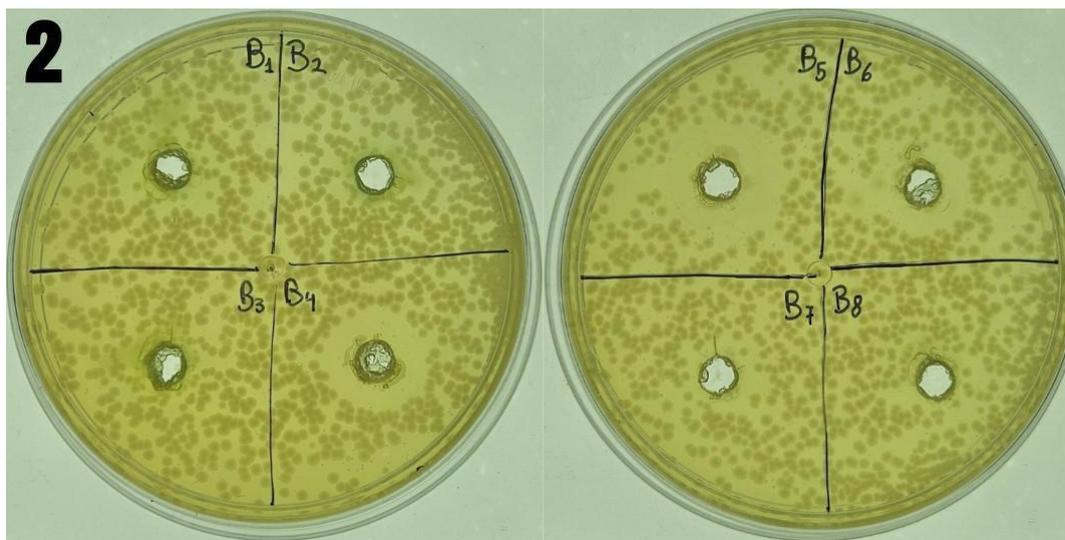


A fração B reunida e concentrada foi chamada de C7B1 para facilitar a compreensão e organização. Então, a fração C7B1 foi resubmetida a cromatografia de exclusão molecular, sobre as mesmas condições da primeira, com o intuito de reduzir o amplo espectro de ação, e

tentar isolar ao máximo a molécula com atividade antimicrobiana. As frações foram coletadas e passaram pelo teste de atividade antimicrobiana.

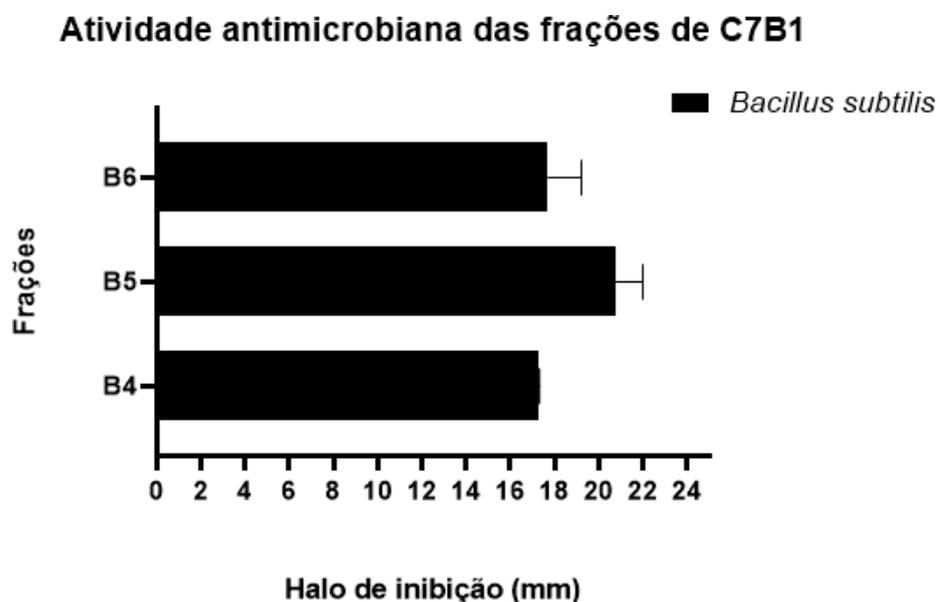
Figura 11. Cromatograma (1) e halos de inibição (2) das frações de C7B1 frente a bactéria *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Em destaque, dentro do quadrado laranja, as frações que apresentaram atividade antimicrobiana. Linha preta –280 nm. Fonte: Autor.





O objetivo da segunda cromatografia foi atingido, já que diminuiu o número de frações com atividades, reduzindo a procura pela molécula. As frações eluídas nos volumes de 21 a 25 ml (B4, B5 e B6) demonstraram a capacidade de inibir a bactéria *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (Fig. 11), porém não inibiu as outras bactérias reveladoras (Figura 12).

Figura 12. Mensuração dos halos de inibição das frações de C7B1 frente a bactéria *Bacillus subtilis* ATCC 6633.



O gênero *Lyngbya* já é conhecido na literatura como uma ótima fonte de diversos compostos bioativos, como metabólitos primários e secundários que possuem atividade antibacterianos, antifúngico, antioxidante, anticâncer, inseticida, fotoprotetora, entre outras (FUENTES-TRISTAN *et al.*, 2019).

Muitos desses compostos, já foram isolados e caracterizados, criando uma expectativa futura para o uso dessas moléculas em novos produtos ou processos biotecnológicos. Por exemplo, a lagunamide (TRIPATHI *et al*, 2010, 2011), é uma classe de ciclodepsipeptídeos, e esses peptídeos possuem atividades diferentes, como atividade antiparasitária, antimicrobiana e citotóxica (THUAN *et al*, 2019). Alguns compostos proeminentes de *Lyngbya*, como dolastatina 10, dolastatina 15, curacina e desmetoximajusculamida C e seus análogos estão em ensaios clínicos como potenciais medicamentos anticancerígenos (SWAIN *et al*, 2015). O análogo sintético da dolastatina 10, chamado de soblidotina já passou pelas fases clínicas I, II e III, e diferentemente da dolastatina 10, esse análogo não apresentou toxicidade elevada, mostrando ter propriedades e características de grande interesse farmacológico (SWAIN *et al*, 2015).

5.7 Cromatografia líquida de fase reserva e atividade antibacteriana das frações.

As frações eluídas no volume de 21 a 25 ml (B4, B5 e B6) foram reunidas e concentradas até 1 ml, e no teste frente às soluções cromatográficas (tópico 4.9), as amostras suportaram e continuaram inibindo a bactéria *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (tab. 8).

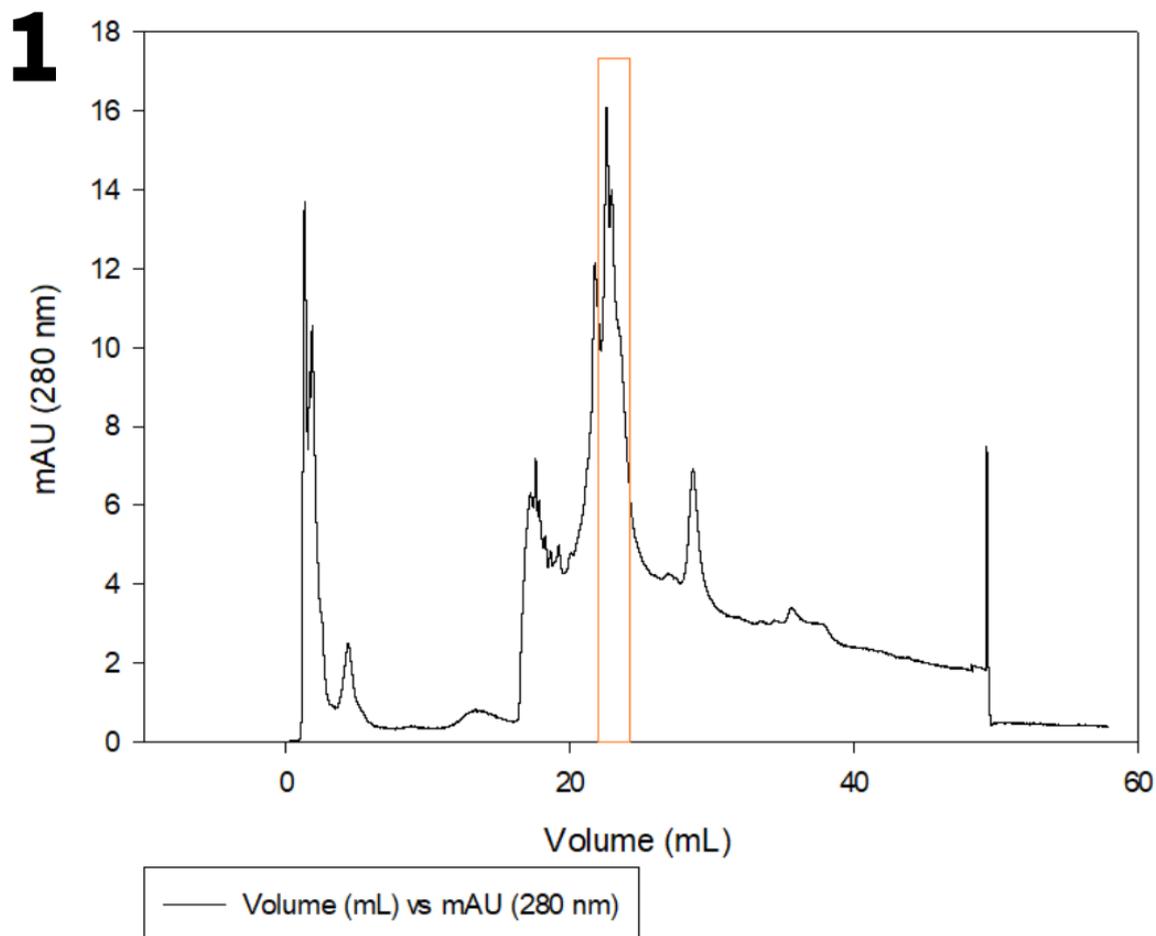
Tabela 8. Teste de atividade antimicrobiana da amostra, mais as substâncias necessárias para a cromatografia de fase reversa .

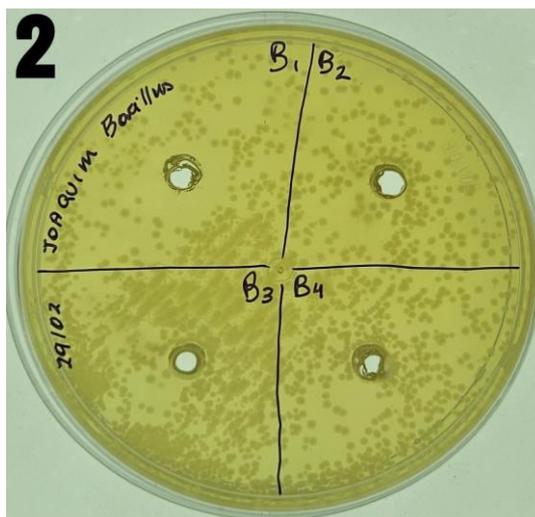
| Soluções | Atividade inibitória (mm) |
|--|---------------------------|
| Amostra + Água ultrapura (controle). | 16,715 |
| Amostra + Água ultrapura + TFA 5% (Ácido trifluoroacético) | 18,105 |
| Amostra + ACN (Acetonitrila) + TFA 5% | 21,71 |

Após a cromatografia de fase reversa em coluna RESOURCE RPC, as frações foram recolhidas e testadas. Somente a fração eluída entre os volumes de 22 a 24 ml (B1) apresentou atividade frente a *Bacillus subtilis* ATCC 6633, sendo compatível com o cromatograma (Fig. 13.1). Todas as frações foram concentradas no *speedvacuum* por 8 horas, onde 1 ml foi reduzido para 100 µL e então testado novamente frente a todas as bactérias reveladoras, e

somente a fração eluída entre os volumes de 21 a 24 ml (B1) mostrou-se com atividade inibitória (Fig. 13.2).

Figura 13: Cromatograma de fase reversa (1) e halos de inibição (2) das frações coletadas da fase reversa frente a bactéria *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Em destaque, dentro do quadrado laranja, a fração que apresentou atividade antimicrobiana. Linha preta – 280 nm. Fonte: Autor.





A bactéria *B. subtilis* é uma espécie reconhecida como segura (GRAS – Generally Recognized As Safe) e que possui muitos estudos referentes à produção de metabólitos com potencial biotecnológico (PARK *et al.*, 2021), então a inibição desta bactéria é somente vista como parâmetro para esses testes antimicrobianos. No entanto, ainda existem espécies do gênero *Bacillus* que são patogênicas para animais e humanos. Um exemplo disso é a *Bacillus anthracis*, responsável pela rara e potencialmente fatal doença do antraz em mamíferos. Além disso, outras espécies, como o *Bacillus cereus*, possuem cepas infecciosas que apresentam sintomas semelhantes aos do antraz (BALDWIN, 2020).

Os isolados de *Salmonella* são subdivididos em sorotipos de acordo com a classificação Kauffmann-White, um sistema criado por esses dois cientistas que classifica as salmonelas baseadas nos seus antígenos (FACON & DESFORGES, 2022). As fórmulas antigênicas dos sorotipos de *Salmonella* são definidas e mantidas pelo Centro Colaborador da Organização Mundial da Saúde (OMS) para Referência e Pesquisa em Salmonella no Instituto Pasteur, em Paris, França. Este Centro Colaborador da OMS é responsável por identificar e catalogar novos sorotipos, que são listados em atualizações anuais do esquema de Kauffmann-White (BRENNER *et al.*, 2000), com uma última atualização em 2008.

As bactérias desse gênero, comumente são vistas como perigosas, principalmente a *S. typhimurium*, um dos sorotipos mais frequentes na causa de doenças transmitidas por alimentos. Ao longo de mais de duas décadas, desenvolveu-se uma crise global em relação a cepa monofásica *Salmonella typhimurium* 1,4,[5],12:i:- que tem sido caracterizada por um aumento da sua resistência aos antibióticos comerciais, se espalhando principalmente pela Europa. O grande problema desta cepa é a sua fácil multiplicação e multirresistência a

diversos tipos de antimicrobianos, como quinolonas, cefotaxima, colistina, gentamicina e cloranfenicol (SUN *et al.*, 2019).

Atualmente o mundo vive na crise dos antibióticos, onde o surgimento de novas cepas resistentes é cada vez mais comum, no estudo de 2010 de Majowicz e colaboradores, estimaram que anualmente cerca de 155 mil pessoas morrem devido a infecção por cepas multirresistente do gênero *Salmonella*. Por isso é importante a bioprospecção de novos agentes antimicrobianos, principalmente os AMPs, que agem com diferentes mecanismos e podem atrasar ou impossibilitar a resistência das bactérias.

5.8 Atividade antifúngica do extrato bruto e frações

Os extratos brutos aquoso, metanólico e clorofórmico e todas as frações seguintes foram testadas contra as leveduras reveladoras presentes no laboratório, e nenhuma amostra mostrou atividade antifúngica, nas condições avaliadas. Estudos demonstram que geralmente um AMP só possui atividade antimicrobiana contra um tipo de microrganismo, devido aos diferentes mecanismos de ação que ele utiliza. Em fungos, por exemplo, os peptídeos antimicrobianos comumente atacam a parede celular ou componente intracelular, essas interações podem interromper a integridade das membranas fúngicas aumentando a permeabilização da membrana plasmática ou formando poros diretamente (BAHAR, REN, 2013).

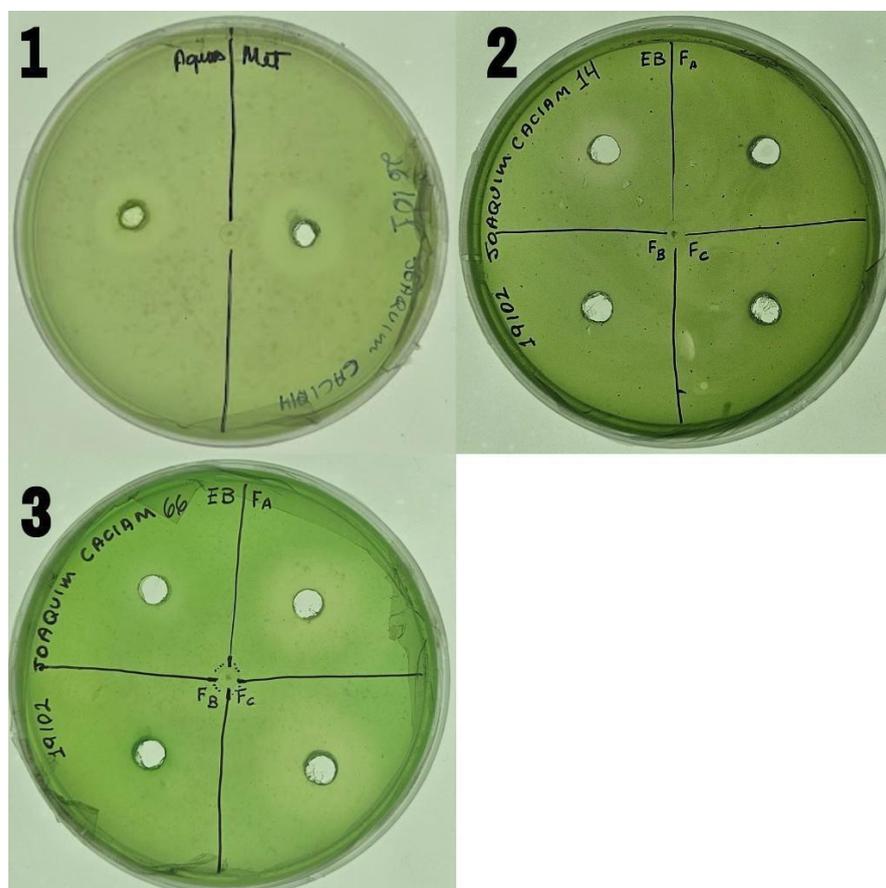
5.9 Atividade alelopática da biomassa, extrato bruto e frações

No teste de alelopatia foram utilizadas todas as cianobactérias reveladoras, *Microcystis aeruginosa* CACIAM 03, *Cyanobium* sp. CACIAM 14 e *Synecochoccus* sp. CACIAM 66, utilizando a biomassa e o extrato aquoso bruto e metanólico da *Lyngbya* sp. CACIAM 07 como os agentes. Depois de 15 dias foi identificado um halo no teste com o extrato aquoso bruto e metanólico frente a cianobactéria *Cyanobium* sp. CACIAM 14 (Fig 14.1).

O segundo teste foi realizado utilizando como possíveis agentes alelopáticos, as frações “A”, “B” e “C” da primeira cromatografia de exclusão molecular (tópico 5.3), e após 15 dias foi possível observar o halo de inibição somente no poço do extrato aquoso bruto contra a *Cyanobium* sp. CACIAM 14 (Fig 14.2). Após 20 dias de foi possível visualizar halos

de inibição nas frações A e C, contra a cianobactéria *Synechococcus* sp. CACIAM 66 (Fig 14.3).

Figura 14: (1) Atividade alelopática do extrato aquoso bruto e metanólico bruto frente a *Cyanobium* sp. CACIAM 14. (2) Atividade alelopática das frações concentradas frente a *Cyanobium* sp. CACIAM 14. (3) Atividade alelopática do extrato bruto e frações concentradas frente a *Synechococcus* sp. CACIAM 66.



As cianobactérias do gênero *Synechococcus* (como a CACIAM 66) geralmente não são conhecidas por causar florações nocivas em águas doces, porém são encontradas relacionadas com as florações de cianobactérias *Microcystis* (BERRY et al., 2016; SIM et al., 2023), gênero conhecido por seu grande crescimento e poluição de corpos d'água, afetando principalmente ao liberar suas cianotoxinas, sendo a microcistina a mais famosa delas. Mesmo não sendo vistas como grandes vilãs, algumas cepas de *Synechococcus* tem a capacidade de liberar cianotoxinas, como a neurotoxina β -N-metilamino-L-alanina, e as mudanças climáticas extremas que estão acontecendo globalmente podem estimular o surgimento de mais cepas produtoras dessas toxinas (SIM et al, 2023).

6. CONCLUSÃO

Conclui-se que, neste trabalho, (1) foi possível detectar e avaliar uma ou mais moléculas da cianobactéria *Lyngbya* sp. CACIAM 07 com atividade antibacteriana e alelopática. (2) Foi possível nomear a molécula antibacteriana como um peptídeo antimicrobiano (AMP), devido ao seu comportamento e ao tamanho da molécula, identificados por técnicas de cromatografia. (3) O extrato bruto com melhores atividades inibitórias, tanto antibacteriana quanto alelopática, foi o extrato aquoso, e (4) essa atividade inibitória não diminuiu após sua purificação. (5) De acordo com a análise cromatográfica, pode haver mais de uma molécula com a habilidade de inibir essas bactérias, atuando sozinhas ou em conjunto. (6) Futuramente, serão necessários mais testes para isolar e identificar essas moléculas.

BIBLIOGRAFIA

ABED, R. M. M.; DOBRETSOV, S.; SUDESH, K. Applications of cyanobacteria in biotechnology. *Journal of applied microbiology*, v. 106, n. 1, p. 1–12, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03918.x>>.

AGEITOS, J. M.; SÁNCHEZ-PÉREZ, A.; CALO-MATA, P.; *et al.* Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria. **Biochemical pharmacology**, vol. 133, p. 117–138, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2016.09.018>>.

BAHAR, Ali and REN, Dacheng. Antimicrobial peptides. **Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)**, vol. 6, no. 12, p. 1543–1575, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/ph6121543>>.

BALDWIN, Victoria M. You can't B. cereus – A review of *Bacillus cereus* strains that cause anthrax-like disease. *Frontiers in microbiology*, v. 11, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2020.01731>>.

BERRY, Michelle A.; DAVIS, Timothy W.; CORY, Rose M.; *et al.* Cyanobacterial harmful algal blooms are a biological disturbance to Western Lake Erie bacterial communities. **Environmental microbiology**, vol. 19, no. 3, p. 1149–1162, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/1462-2920.13640>>.

BRENNER, F. W.; VILLAR, R. G.; ANGULO, F. J.; *et al.* *salmonella* nomenclature. **Journal of clinical microbiology**, vol. 38, no. 7, p. 2465–2467, 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/jcm.38.7.2465-2467.2000>>.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. CLSI supplement M100 (ISBN 978-1-68440-066-9 [Print]; ISBN 978-1-68440-067-6 [Electronic]). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2020.

CLSI. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: thirty informational supplements**. [s.l.]: Clinical & Laboratory Standards Institute, 2020.

CONSTANTIN, J. *Biologia e manejo de plantas daninhas*. [s.l.] Omnipax Editora, 2011.

COVINGTON, Brett C.; MCLEAN, John A.; BACHMANN, Brian O. Comparative mass spectrometry-based metabolomics strategies for the investigation of microbial secondary metabolites. *Natural product reports*, v. 34, n. 1, p. 6–24, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/c6np00048g>>.

DEMAIN, ARNOLD L.; FANG, AIQI. The Natural Functions of Secondary Metabolites. *History Of Modern Biotechnology I*, [S.L.], p. 1-39, 2000. Springer Berlin Heidelberg. 38 DU, XIAO-YAN; CLEMETSON, KENNETH J. Snake venom l-amino acid oxidases. *Toxicon*, [S.L.], v. 40, n. 6, p. 659-665, 2002. Elsevier BV.

DEMOULIN, Catherine F.; LARA, Yannick J.; CORNET, Luc; *et al.* Cyanobacteria evolution: Insight from the fossil record. **Free radical biology & medicine**, vol. 140, p. 206–223, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.007>>.

DESHAYES, Caroline; ARAFATH, Md Nasir; APAIRE-MARCHAIS, Véronique; *et al.* Drug

delivery systems for the oral administration of antimicrobial peptides: Promising tools to treat infectious diseases. *Frontiers in medical technology*, v. 3, p. 778645, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3389/fmedt.2021.778645>>.

FERREIRA, Alfredo Gui. ALELOPATIA: UMA ÁREA EMERGENTE DA ECOFISIOLOGIA. 2000.

FUENTES-TRISTAN, Susana; PARRA-SALDIVAR, Roberto; IQBAL, Hafiz M. N.; et al.

Bioinspired biomolecules: Mycosporine-like amino acids and scytonemin from *Lyngbya* sp. with UV-protection potentialities. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, v. 201, n. 111684, p. 111684, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111684>>

GOMES, F. G., Jr; CHRISTOFFOLETI, P. J. Biologia e manejo de plantas daninhas em áreas de plantio direto. **Planta daninha**, v. 26, n. 4, p. 789–798, 2008. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1590/s0100-83582008000400010>>.

GORHAM, Paul R. Toxic algae as a public health hazard. **Journal - American Water Works Association**, vol. 56, no. 11, p. 1481–1488, 1964. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1002/j.1551-8833.1964.tb01355.x>>.

GROSS, MICHAEL. Antibiotics in crisis. *Current Biology*, [S.L.], v. 23, n. 24, p. 1063- 1065, 2013. Elsevier BV.

GROSS, Jurgen H. *Mass Spectrometry: A Textbook*. 3. ed. Cham, Switzerland: Springer International Publishing, 2017.

GUMBO, R.; JABULANI and ROSS, Gina. **Biological control of Microcystis dominated harmful algal blooms**. [s.l.: s.n., s.d.].

HANCOCK, Robert E. W.; SAHL, Hans-Georg. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature biotechnology*, v. 24, n. 12, p. 1551–1557, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nbt1267>>.

JANEIRO. **Salmonella Enteritidis e Typhimurium: os dois principais sorotipos responsáveis por infecções em humanos**. bioMérieux industrial microbiology. Disponível em:

<<https://www.biomerieux-industry.com/pt/seguranca-qualidade-de-alimentos/espaco-de-conhecimento/biblioteca-de-micro-organismos-em-7>>. Acesso em: 18 May 2024.

JANEIRO. **Salmonella Enteritidis e Typhimurium: os dois principais sorotipos responsáveis por infecções em humanos**. bioMérieux industrial microbiology. Disponível em:

<<https://www.biomerieux-industry.com/pt/seguranca-qualidade-de-alimentos/espaco-de-conhecimento/biblioteca-de-micro-organismos-em-7>>. Acesso em: 18 May 2024.

JANSSEN, Elisabeth M-L. Cyanobacterial peptides beyond microcystins – A review on co-occurrence, toxicity, and challenges for risk assessment. **Water research**, vol. 151, p. 488–499, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2018.12.048>>.

JONES, R. N. NCCLS guidelines: revised performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. **Antimicrobial newsletter**, v. 1, n. 8, p. 64–65, 1984. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/0738-1751\(84\)90027-3](http://dx.doi.org/10.1016/0738-1751(84)90027-3)>.

JP, Guggenbichler. Dramatic Increase of Multi-Resistant Microorganisms is Selfinflicted.

Effective and Easy Solutions Are Available. **Journal of Clinical and Medical Images**, v. 06, n. 10, 2022. Disponível em: <https://www.clinandmedimages.com/wp-content/uploads/2022/05/JCMI-v6-1545.pdf>. Acesso em: 18 maio 2024.

KEYMANESH, Keykhosrow; SOLTANI, Saeed and SARDARI, Soroush. Application of antimicrobial peptides in agriculture and food industry. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, vol. 25, no. 6, p. 933–944, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-009-9984-7>.

KULASOORIYA, S. A. Cyanobacteria: Pioneers of Planet Earth. **Ceylon journal of science: Biological sciences**, vol. 40, no. 2, p. 71–88, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4038/cjsbs.v40i2.3925>.

KULTSCHAR, Bethan and LLEWELLYN, Carole. Secondary metabolites in Cyanobacteria. *In: Secondary Metabolites - Sources and Applications*. [s.l.]: InTech, 2018.

WILLYARD, Cassandra. The drug-resistant bacteria that pose the greatest health threats.

Nature, vol. 543, no. 7643, p. 15–15, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nature.2017.21550>.

LEAL, ANDRÉA DE CASTRO; SOARES, MANOEL DO CARMO PEREIRA. Hepatotoxicidade da cianotoxina microcistina. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, [S.L.], v. 37, n. 2, p. 84-89, 2004. FapUNIFESP (SciELO).

LEFLAIVE, Joséphine and TEN-HAGE, Loïc. Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins. **Freshwater biology**, vol. 52, no. 2, p. 199–214, 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2427.2006.01689.x>.

LIU, Li and REIN, Kathleen S. New peptides isolated from *Lyngbya* species: A review. **Marine drugs**, vol. 8, no. 6, p. 1817–1837, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/md8061817>.

MA, Xuanxuan; AMINOV, Rustam; FRANCO, Octavio Luiz; et al. Editorial: Antimicrobial peptides and their druggability, bio-safety, stability, and resistance. *Frontiers in microbiology*, v. 15, p. 1425952, 2024. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2024.1425952>.

MAJOWICZ, Shannon E.; MUSTO, Jennie; SCALLAN, Elaine; et al. The global burden of nontyphoidal *salmonella* gastroenteritis. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, vol. 50, no. 6, p. 882–889, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1086/650733>.

MOHR, KATHRIN I. History of Antibiotics Research. *Current Topics In Microbiology And Immunology*, [S.L.], p. 237-272, 2016. Springer International Publishing

MUNDT, Sabine; KREITLOW, Susann; NOWOTNY, Andrea; et al. Biochemical and pharmacological investigations of selected cyanobacteria. **International journal of hygiene and environmental health**, vol. 203, no. 4, p. 327–334, 2001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1078/1438-4639-00045>.

NCCLS. “Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Twelfth Edition”. NCCLS document M02-A12. USA, 2015.

ORLANDO, Aliff Muhammad; ARDIANSYAH, Sulthan Rafii; RAHMAN, Arif; et al. Effects of aeration intensity as agitation in simple photobioreactors on *leptolyngbya*

(cyanobacteria) growth as biofuel feedstock. **E3S web of conferences**, vol. 67, p. 02011, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1051/e3sconf/20186702011>>.

PANDEY, Supriya; NARAYANAN, Ishvarya; VINAYAGAM, Ramesh; *et al.* A review on the effect of blue green 11 medium and its constituents on microalgal growth and lipid production. **Journal of environmental chemical engineering**, vol. 11, no. 3, p. 109984, 2023. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2023.109984>>.

PARK, Seo A.; BHATIA, Shashi Kant; PARK, Hyun A.; *et al.* *Bacillus subtilis* as a robust host for biochemical production utilizing biomass. **Critical reviews in biotechnology**, vol. 41, no. 6, p. 827–848, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/07388551.2021.1888069>>.

RASTOGI, RAJESH P.; SINHA, RAJESHWAR P. Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, [S.L.], v. 27, n. 4, p. 521-539, 2009. Elsevier BV.

RIPPKA, Rosmarie; STANIER, Roger Y.; DERUELLES, Josette; *et al.* Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of Cyanobacteria. **Microbiology (Reading, England)**, vol. 111, no. 1, p. 1–61, 1979. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1099/00221287-111-1-1>>.

ROJAS, Verónica; RIVAS, Luis; CÁRDENAS, Constanza; *et al.* Cyanobacteria and eukaryotic microalgae as emerging sources of antibacterial peptides. **Molecules (Basel, Switzerland)**, vol. 25, no. 24, p. 5804, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/molecules25245804>>.

SANG, Yongming; BLECHA, Frank. Antimicrobial peptides and bacteriocins: alternatives to traditional antibiotics. **Animal health research reviews**, v. 9, n. 2, p. 227–235, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1017/S1466252308001497>>.

SCHUURMANS, J. Merijn; BRINKMANN, Bregje W.; MAKOWER, A. Katharina; *et al.* Microcystin interferes with defense against high oxidative stress in harmful cyanobacteria. **Harmful algae**, vol. 78, p. 47–55, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.hal.2018.07.008>>.

SILVA-STENICO, Maria Estela; SILVA, Caroline Souza Pamplona; LORENZI, Adriana Sturion; *et al.* Non-ribosomal peptides produced by Brazilian cyanobacterial isolates with antimicrobial activity. **Microbiological research**, vol. 166, no. 3, p. 161–175, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2010.04.002>>.

SIM, Zhi Yang; GOH, Kwan Chien; HE, Yiliang; *et al.* Present and future potential role of toxin-producing *Synechococcus* in the tropical region. **The Science of the total environment**, vol. 896, no. 165230, p. 165230, 2023. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.165230>>.

SIQUEIRA, Danilo Barbosa and OLIVEIRA-FILHO, Eduardo Cyrino. Cianobactérias de água doce e saúde pública: uma revisão. **Universitas Ciências da Saúde**, vol. 3, no. 1, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5102/ucs.v3i1.549>>.

STRIETH, Dorina; LENZ, Selina; ULBER, Roland. In vivo and in silico screening for antimicrobial compounds from cyanobacteria. *MicrobiologyOpen*, v. 11, n. 2, 2022. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/mbo3.1268>>.

SUN, Honghu; WAN, Yuping; DU, Pengcheng; *et al.* The epidemiology of

monophasic *salmonella typhimurium*. **Foodborne pathogens and disease**, vol. 17, no. 2, p. 87–97, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2019.2676>>.

SWAIN, Shasank S.; PADHY, Rabindra N.; SINGH, Pawan K. Anticancer compounds from cyanobacterium *Lyngbya* species: a review. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 108, n. 2, p. 223–265, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10482-015-0487-2>>.

THACKER, Robert W. and PAUL, Valerie J. Morphological, Chemical, and Genetic Diversity of Tropical Marine Cyanobacteria *Lyngbya* spp. and *Symploca* spp. (*Oscillatoriales*). **Applied and environmental microbiology**, vol. 70, no. 6, p. 3305–3312, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/aem.70.6.3305-3312.2004>>.

TRIPATHI, Ashootosh; PUDDICK, Jonathan; PRINSEP, Michèle R.; *et al.* Lagunamides A and B: Cytotoxic and antimalarial cyclodepsipeptides from the marine Cyanobacterium

Lyngbya majuscula. **Journal of natural products**, vol. 73, no. 11, p. 1810–1814, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/np100442x>>.

THUAN, Nguyen Huy; AN, Tran Tuan; SHRESTHA, Anil; *et al.* Recent advances in exploration and biotechnological production of bioactive compounds in three cyanobacterial genera: *Nostoc*, *Lyngbya*, and *Microcystis*. *Frontiers in chemistry*, v. 7, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3389/fchem.2019.00604>>.

VAN HARTEN, Roel M.; VAN WOUDEBERGH, Esther; VAN DIJK, Albert; *et al.* Cathelicidins: Immunomodulatory antimicrobials. **Vaccines**, vol. 6, no. 3, p. 63, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/vaccines6030063>>.

WANG, Cheng; HONG, Tingting; CUI, Pengfei; *et al.* Antimicrobial peptides towards clinical application: Delivery and formulation. *Advanced drug delivery reviews*, v. 175, n. 113818, p. 113818, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2021.05.028>>.

WIKLER, Matthew A. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved standard**. 11. ed. [s.l.]: Clinical & Laboratory Standards Institute, 2012.

WILLYARD, Cassandra. The drug-resistant bacteria that pose the greatest health threats. **Nature**, vol. 543, no. 7643, p. 15–15, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature.2017.21550>>.

WRIGHT, GERARD D. Solving the Antibiotic Crisis. *Acs Infectious Diseases*, [S.L.], v. 1, n. 2, p. 80-84, 2015. American Chemical Society (ACS).

YUSOF, Tengku Nadiah; RAFATULLAH, Mohd; MOHAMAD, Rohaslinda; *et al.* Cyanobacteria characteristics and methods for isolation and accurate identification of cyanotoxins: A review article. **Avicenna journal of environmental health engineering**, vol. 4, no. 1, p. 10051–10051, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5812/ajehe.10051>>.

ZAGATTO, P. A. & ARAGÃO, M. A., 1992, Toxicidade de cianofíceas (algas azuis) do reservatório do Guarapiranga, SP. *Resumos do II Encontro de Ecotoxicologia*, Cassino, Rio Grande, RS, 55p

ZASLOFF, Michael. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, vol. 415, no. 6870, p. 389–395, 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/415389a>>.