

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

**Estratégia de pré-fracionamento e bioensaios para a triagem
de produtos naturais de cianobactérias brasileiras**

Leonardo de Faria Figueiredo

Trabalho de Conclusão do Curso de
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo.

Orientadora:

Prof^a. Dra. Camila Manoel Crnkovic
(FCF-USP)

Departamento de Tecnologia
Bioquímico-Farmacêutica

São Paulo
2023

AGRADECIMENTOS

Aos meus professores e orientadores

Primeiramente gostaria de expressar minha gratidão à minha orientadora Profa. Dra. Camila Manoel Crnkovic por sua dedicação e orientação valiosa ao longo deste processo desafiador. Seu conhecimento, paciência e incentivo foram fundamentais para o sucesso deste trabalho. Sua orientação contribuiu significativamente para o profissional que me tornei, e sou muito grato por tê-la como mentora. Obrigado por seu comprometimento e apoio durante esta jornada.

Gostaria também de agradecer profundamente ao Prof. Dr. Frederico Gueiros, pela sua orientação conjunta durante o projeto de Iniciação Científica, que resultou neste trabalho.

À minha mãe, Eliana Machado de Faria

Acredito que eu não tenha palavras para expressar adequadamente a ternura e admiração que carrego comigo, serei sempre grato pelo seu amor e apoio incondicional constante ao longo de minha vida. Muito obrigado mãe, por iluminar o caminho à minha frente e por ser essa imagem de força e superação, me permitindo alcançar meus sonhos e ideais.

Ao meu pai, Luiz Fernando de Figueiredo

Desde que eu me reconheço como pessoa posso descrever sua presença como uma figura de sabedoria e alegria. Minha memória é repleta de seus ensinamentos e experiências que moldaram os valores e caráter que tenho até hoje. Muito obrigado pai, pelo seu amor, compreensão e pelos ensinamentos que me trouxeram até aqui.

À minha tia, Leda Machado de Faria

Uma segunda figura materna em minha vida, serei eternamente grato pelo seu carinho e amor. Você não apenas enriqueceu minha infância com sua presença cativante e histórias de vida, mas deixou uma marca indelével em meu coração.

Ao meu tio, Carlos Machado de Faria

Saudades.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	3
LISTA DE ABREVIATURAS	5
RESUMO.....	5
1. Introdução.....	6
2. Objetivos Gerais	10
2.1 Objetivos Específicos	10
3. Material e Métodos	10
3.1 Material Biológico, Cultivo e Extração.....	10
3.2 Pré-fracionamento de Extratos	11
3.3 Ensaios de Atividade Antimicrobiana.....	12
4. Resultados e Discussão	13
4.1 Crescimento Bacteriano Frente a Antimicrobianos Conhecidos	13
4.1.1 <i>Bacillus subtilis</i>	14
4.1.2 <i>Escherichia coli</i>	15
4.2 Fracionamento.....	18
4.3 Bioensaios com Extratos e Frações	19
4.4 Linhagens CCIBt3551 e CCIBt3265	23
5. Conclusão.....	27
6. Referências	28
Anexo A.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS

MIC	Minimum inhibitory concentration
HTS	<i>High-throughput screening</i>
CCIBt	Coleção de Culturas de Cianobactérias do Instituto de Botânica
LB	Luria-Bertani
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
PAINs	<i>Pan-assay interference compounds</i>
SPE	<i>Solid phase extraction</i>
MRSA	<i>methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>

RESUMO

FIGUEIREDO, L. F. **Estratégia de pré-fracionamento e bioensaios para a triagem de produtos naturais de cianobactérias brasileiras**. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Palavras-chave: Cianobactéria; metabólitos secundários; antimicrobianos;

Produtos naturais oferecem um amplo espectro de oportunidades para a descoberta de antibióticos. Apesar disso, a aparente incompatibilidade dos extratos biológicos com triagens por *high-throughput screening* e o aumento da “redescoberta” de compostos representam obstáculos para a identificação de novos antimicrobianos. Cianobactérias são produtoras prolíficas de metabólitos secundários, porém seu potencial farmacêutico ainda é pouco estudado. Estratégias de pré-fracionamento podem possibilitar a redução da complexidade química de extratos e uma melhor compatibilidade com o bioensaio. Nesse sentido, o presente trabalho se propõe a explorar o potencial das cianobactérias como fonte de novos antimicrobianos, através do uso de estratégias de pré-fracionamento e triagem guiada por bioatividade, e investigando como pequenas concentrações de antibióticos presentes nos extratos biológicos podem afetar o desenvolvimento bacteriano nos bioensaios. Primeiramente foi feita a investigação da cinética de crescimento bacteriano das linhagens *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli* frente a diferentes concentrações de antibióticos conhecidos, afim de determinar como pequenas concentrações de antimicrobianos iriam influenciar o crescimento bacteriano. As placas foram incubadas por 24 horas com leituras automáticas a cada 10 minutos. Posteriormente, extratos de cianobactérias brasileiras foram pré-fracionados por extração em fase sólida, utilizando resina HP20SS e gradiente de isopropanol e água. Os extratos e frações foram analisados em ensaios de atividade antimicrobiana. Através das análises da cinética de crescimento com antimicrobianos padronizados foi possível observar que concentrações até 50x menores que o MIC podem ser capazes de interferir no desenvolvimento bacteriano, atrasando a fase log e diminuindo a inclinação da curva de crescimento. Dos 9 extratos fracionados, 6 obtiveram um rendimento do processo superior à 70%. Dentre as 9 linhagens analisadas, 4 apresentaram amostras com atividade frente a *B. subtilis* e nenhuma frente a *E. coli*. A curva de crescimento bacteriano pode ser utilizada como uma ferramenta na triagem de extratos biológicos para atividade antimicrobiana, visando à identificação da presença de antimicrobianos em concentrações mínimas. O método de pré-fracionamento foi considerado eficaz, separando os compostos do extrato em frações de menor complexidade química e beneficiando os bioensaios.

1. Introdução

Agentes antimicrobianos são definidos como substâncias de origem natural ou sintética, que possuem a capacidade de destruir ou inibir o crescimento de microrganismos (Tavares, 2014). Estes compostos são indispensáveis para o tratamento de infecções, sendo uma das classes de fármacos mais comumente prescritas (Sancho, 2022).

Desde o início do século XX, a descoberta de antibióticos permitiu grande avanço no tratamento de infecções bacterianas. Começando com o trabalho de Paul Ehrlich, considerado o pai da quimioterapia (Nogueira *et al.*, 2009). Ehrlich criou o conceito da “*magic bullet*”, um dos fundamentos da farmacologia, que seria um fármaco ideal que atinja seu alvo, sem provocar efeitos colaterais ou afetar negativamente o paciente (Aminov, 2010). Seu estudo sobre colorações histológicas, em 1910, levou à identificação do salvarsan, efetivo para o tratamento de sífilis e sendo um dos primeiros antibióticos de origem sintética (Gould, 2016).

Alguns anos depois, o médico e bacteriologista Alexander Fleming retornava da Primeira Guerra Mundial, quando iniciou sua pesquisa em busca de um fármaco para o tratamento das infecções dos soldados feridos em batalha. Suas observações permitiram a descoberta do primeiro antibiótico de origem natural, a penicilina. O isolamento da penicilina, em 1939, representou a introdução dos antimicrobianos modernos (Gaynes, 2017). A humanidade entrava numa fase exponencial de descoberta desses compostos, atingindo seu ápice entre 1950 e 1960 (Hutchings *et al.*, 2019). A chamada “era de ouro dos antibióticos” resultou na descoberta de mais da metade dos antibióticos utilizados atualmente. A introdução dos antibióticos permitiu o aumento da qualidade e expectativa de vida, não se limitando somente ao cuidado humano, mas também sendo amplamente empregados na pecuária (Hegemann, 2023). Em razão dos benefícios proporcionados pela utilização de antibióticos, é possível observar, retrospectivamente, que sua administração se tornou excessiva e indiscriminada (Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022; Hegemann, 2023).

O Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, em 2014, reportou possivelmente o primeiro caso brasileiro de *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina. A linhagem, que já é resistente à meticilina, adquiriu resistência à vancomicina após receber o gene “vanA” (Rossi *et al*, 2014). O grupo “*Antimicrobial Resistance Collaborators*” pode estimar, através da realização de um estudo estatístico preditivo, que somente no ano de 2019 foram identificadas 4,95 milhões de mortes associadas a infecções bacterianas resistentes. Dados como estes demonstram que o amplo espectro de antibióticos existentes hoje não mais constitui uma barreira eficaz contra a ameaça das infecções bacterianas (Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022).

Produtos naturais oferecem oportunidades para a descoberta de novas moléculas com aplicações terapêuticas e biotecnológicas (Clardy e Walsh, 2004; Cragg e Newman, 2013). Antimicrobianos de origem natural e seus derivados representam a maior parte dos antibióticos de uso clínico. 70% das 126 pequenas moléculas aprovadas entre 1981 e 2019, para uso como antibióticos, têm alguma relação com compostos naturais, incluindo produtos naturais não modificados, derivados semissintéticos e fármacos sintéticos inspirados em esqueletos químicos naturais (Newman e Cragg, 2020).

Apesar de sua relevância, o interesse das indústrias farmacêuticas nos produtos naturais diminuiu significativamente nas últimas três décadas (Harvey *et al*, 2015; Li e Vederas, 2009). A aparente incompatibilidade dos extratos biológicos com triagens por HTS (*high-throughput screening*), somada ao aumento da “redescoberta” de compostos, contribuíram para o desinteresse do setor (Bisson *et al.*, 2016; Harvey, Edrada-Ebel e Quinn, 2015; Koehn e Carter, 2005; Li *et al.*, 2019; Le e Vederas, 2009; Pye *et al.*, 2017).

Extratos biológicos são, em geral, misturas complexas, contendo centenas (ou até milhares) de substâncias, dentre elas, compostos que formam agregados, pigmentos e outros artefatos que podem interferir em bioensaios (Bisson *et al.*, 2016). A ampla faixa de concentrações dos produtos naturais nos extratos representa um dos maiores desafios para a compatibilização com ensaios biológicos e triagens por HTS, levantando questões sobre sua

sensibilidade a moléculas bioativas em baixos níveis (Bugni *et al.*, 2008). Antibióticos em concentrações inferiores à mínima inibitória (MIC) ainda são capazes de interferir na formação de biofilme e reduzir o crescimento bacteriano (Wojnicz e Tichaczek-Goska, 2012). Nesse sentido, explorar como baixas concentrações de antimicrobianos impactam o desenvolvimento bacteriano é um passo importante na compatibilização de extratos biológicos com bioensaios em *high-throughput screening*.

O desenvolvimento de novas estratégias de bio e químioprospecção, somadas à exploração de organismos ainda pouco estudados, contribuíram para revitalizar o interesse nos produtos naturais (Clardy e Walsh, 2004). Estratégias de pré-fracionamento foram desenvolvidas para a simplificação de extratos biológicos, aumentando sua compatibilidade com plataformas HTS (Bugni *et al.*, 2008; Harvey, Edrada-Ebel e Quinn, 2015). Os ensaios biológicos utilizados também passaram a ser questionados e adaptados para os desafios específicos das triagens de produtos naturais (Fallarero, Hanski e Vuorela, 2014). É importante mencionar ainda o desenvolvimento de diversas técnicas de desreplicação, metabolômica e genômica, que expandiram as fronteiras da pesquisa em produtos naturais (Covington, Mclean e Bachmann, 2017; Gaudêncio e Pereira, 2015; Tawfike, Viegelmann e Edrada-Ebel, 2013; Zhang *et al.*, 2017). Além das inovações tecnológicas, a ampliação da diversidade biológica analisada é imprescindível. Organismos pouco explorados oferecem oportunidades para a descoberta de moléculas bioativas (Pye *et al.*, 2017).

As cianobactérias, popularmente chamadas de algas azuis, constituem um grupo particular dentre os procariotos. São consideradas uma das primeiras formas de vida do planeta, com registros fósseis datados de 3,5 bilhões de anos (Damazio, 2006). Cianobactérias são encontradas nos mais diversos habitats: terrestre, marinho, em água doce e salobra. São também, capazes de sobreviver a condições hostis como seca, alta salinidade e alta temperatura (Kehr, Picchi e Dittmann, 2011). Estes microrganismos não apresentam núcleo nem plastos, entretanto a presença de pigmentos como a clorofila e ficobilinas, associados a estruturas como tilacóides, lhes conferem a capacidade de realizar fotossíntese (Sant'anna, C L *et al.*, 2011).

O Brasil ocupa uma posição privilegiada no contexto da diversidade biológica, destacando-se como um dos 17 países megadiversos. Seu território detém 13% de todas as espécies identificadas no mundo, e possui a segunda maior variedade de espécies endêmicas em valor absoluto (Pimentel *et al.*, 2015). São identificadas, apenas na Mata Atlântica, mais de 8,000 espécies endêmicas de plantas vasculares, anfíbios, répteis, aves e mamíferos (Vale *et al.*, 2009). Em relação às cianobactérias, até 2015 foram registradas 4.747 espécies presentes no território brasileiro (Menezes, M *et al.* 2015), sendo as regiões Sudeste e Sul consideradas as mais estudadas.

Além de sua importância ecológica como produtores de metabólitos primários, cianobactérias são produtoras prolíficas de metabólitos secundários. Já se tem registro de diversos compostos bioativos produzidos por estes organismos que possuem atividade antibacteriana (Shishido *et al.*, 2019). Dentre as principais classes de compostos antimicrobianos identificados a partir de cianobactérias estão os policetídeos, peptídeos, terpenos, alcalóides e polifenóis (Carpine e Sieber, 2021). No grupo dos policetídeos, podemos destacar principalmente os carbamidociclofanos, que demonstraram concentrações mínimas inibitórias em grandeza nanomolar frente a *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) (Preisitsch *et al.*, 2015; Carpine e Sieber, 2021). Já quanto aos alcalóides, compostos como as ambiguinas, fischerindoles e fischerellinas, que possuem estrutura similar do tipo hapalindol, foram identificados em diversos gêneros de cianobactérias e demonstraram potente atividade frente a bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (Levitsky *et al.*, 2016; Carpine e Sieber, 2021).

Em 2010, um estudo feito pela Universidade de São Paulo demonstrou o potencial farmacológico desses organismos. Na pesquisa realizada, foram testados extratos de 50 espécies de cianobactérias pertencentes às ordens Chroococcales, Oscillatoriales, Nostocales e Stigonematales. Dentre os extratos testados, 30% apresentaram atividade contra bactérias Gram-positivas e 17% contra gram-negativas. Desta forma, 48% das espécies avaliadas apresentaram capacidade de produção de compostos antimicrobianos (Silva-Stenico *et al.*, 2011). Apesar da ampla biodiversidade e potencial farmacêutico representado

pelas cianobactérias, seu estudo ainda é incipiente em nosso país. Alguns poucos estudos puderam identificar o potencial das cianobactérias brasileiras como fonte de produtos naturais com atividade antimicrobiana (Shishido *et al.*, 2019; Silva-Stenico *et al.*, 2011).

A fim de aprofundar a investigação do potencial dos produtos naturais e sua compatibilidade com bioensaios em modelo HTS, o presente trabalho se propõe a realizar a bioprospecção de extratos obtidos de cianobactérias brasileiras com foco em atividade antimicrobiana, explorando como baixas concentrações de antibióticos podem impactar o desenvolvimento bacteriano e se utilizando de estratégias de pré-fracionamento e triagem guiada por bioatividade.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar o pré-fracionamento e a triagem de extratos e frações contendo produtos naturais de cianobactérias brasileiras em bioensaio de atividade antimicrobiana, bem como investigar como baixas concentrações de compostos antimicrobianos podem afetar o crescimento bacteriano.

2.2 Objetivos Específicos

- Investigar o perfil de crescimento bacteriano frente à diferentes concentrações de antimicrobianos conhecidos;
- Realizar o pré-fracionamento de extratos cianobacterianos;
- Testar os extratos e frações cianobacterianos em bioensaios de atividade antimicrobiana;

3. Material e Métodos

3.1 Material Biológico, Cultivo e Extração

As linhagens investigadas nesse estudo (Quadro 1) compõem a Coleção de Culturas de Cianobactérias do Instituto de Botânica (CCIBt), sob curadoria da Profa. Célia Sant'Anna (cadastro da atividade de acesso no Sisgen A531C68). Seu cultivo e extração foram realizados com o auxílio do Me. Márcio Weiss e do estudante de iniciação científica João Pedro Brandão. As linhagens

foram cultivadas por oito semanas sob aeração estéril a temperatura de 25 °C e irradiação de 40 $\mu\text{mol f\acute{otons.m}^{-2}.s^{-1}}$. Após esse período, as biomassas foram coletadas e liofilizadas. Os extratos foram obtidos através da maceração das biomassas liofilizadas com 200 mL diclorometano:metanol 1:1 em Erlenmeyers de 500 mL (3x). Extratos foram filtrados, concentrados em rotaevaporador e transferidos para vials de vidro pré-pesados, onde foram secos sob fluxo de nitrogênio.

Quadro 1 – Linhagens de cianobactérias

Linhagem		Local de coleta	Meio de cultivo
CCIBt3551	<i>Brasilonema octagenarum</i>	Mata Atlântica do Parque Estadual da Ilha Cardoso, Cananéia - SP	BG-11
CCIBt3320	<i>Calothrix</i> sp.	Mata Atlântica do Parque Estadual da Serra do Mar, Núcleo Santa Virgínia, São Luiz do Paraitinga- SP	BG-0
CCIBt3265	<i>Desertifilum tharense</i>	Pantanal de Nhecolândia, Corumbá - MS	BG-11
CCIBt3214	<i>Anagnostidinema amphibium</i>	Mata Atlântica, Reservatório Billings, Estado de São Paulo	ASM-1
CCIBt3496	<i>Myxosarcina</i> sp.	Estação Ecológica de Juréia-Itatins, Peruíbe - SP	BG-11
CCIBt3338	<i>Leptolyngbya</i> sp.	Cerrado, Pirassununga – SP	BG-11
CCIBt3307	<i>Komarekiella atlantica</i>	Mata Atlântica do Parque Estadual da Serra do Mar, Núcleo Santa Virgínia, São Luiz do Paraitinga - SP	BG-0
CCIBt3275	<i>Desertifilum tharense</i>	Pantanal de Nhecolândia, Corumbá - MS	BG-11
CCIBt3329	<i>Nostoc</i> sp.	Cerrado, Pirassununga – SP	BG-0

Fonte: Leonardo de Faria Figueiredo, 2023 (autoral)

3.2 Pré-fracionamento de Extratos

Os extratos foram pré-fracionados por SPE, utilizando resina HP20SS (proporção resina:extrato no mínimo 10:1) e gradiente de isopropanol e água (IPA:H₂O, 0:100, 20:80, 40:60, 70:30, 90:10 e 100:0) (CRNKOVIC, 2018). As frações foram secas sob fluxo de nitrogênio e armazenadas em vials de 4 mL pré-pesados para composição de biblioteca de frações. Uma vez secos, os vials contendo as amostras foram pesados novamente, de forma a obter a massa total das frações, permitindo o cálculo do rendimento do processo.

$$\% \text{ de rendimento} = \left(\frac{M_f}{M_i} \right) \times 100$$

M_i = massa inicial do extrato

M_f = massa total das frações

3.3 Ensaios de Atividade Antimicrobiana

Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados com as linhagens Gram-positiva *Bacillus subtilis* PY79 e Gram-negativa *Escherichia coli* ATCC 25922, em colaboração com o Prof. Frederico José Gueiros Filho (IQ-USP) e com o apoio do Dr. João Costa Filho.

No dia anterior à execução do bioensaio, foi realizado o repique das células em ágar Luria-Bertani (LB). No dia da realização do experimento, as colônias foram transferidas para cerca de 300 mL de caldo Mueller-Hinton 2 com cátiões ajustados, crescendo até a fase log, quando foram diluídas a 1×10^6 UFC.mL⁻¹, em meio igual ao do inóculo. 145 µL de suspensão bacteriana foram misturados com 5 µL de solução de DMSO, contendo as frações, extratos ou antibióticos analisados. Foi utilizado como controle negativo DMSO 3% e como controle positivo amoxicilina 4 µg.mL⁻¹. Os extratos e frações foram analisados nas concentrações de 50 µg.mL⁻¹, em placas de 96 poços, em triplicata. As leituras foram realizadas em leitor de placas Biotek Epoch, em comprimento de onda de 600 nm.

Foi investigada a cinética de crescimento bacteriano frente aos seguintes antibióticos: tetraciclina, amoxicilina, fosfomicina, eritromicina, ampicilina, rifampicina, trimetoprim, espectinomicina e piperacilina, em diferentes concentrações e em duplicatas. Foram feitas leituras automatizadas a cada 10 minutos, durante 24 horas, utilizando o leitor automático de placas SpectraMax® Paradigm em comprimento de onda de 600 nm. O percentual de inibição de crescimento foi calculado através da razão entre a absorbância obtida na análise com a presença do antimicrobiano e o respectivo controle negativo (inóculo adicionado de apenas DMSO) como demonstrado na seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = \left(1 - \left(\frac{M_a - B}{C - B} \right) \right) \times 100$$

M_a = média das análises

C = média do controle

B = Branco

4. Resultados e Discussão

4.1 Crescimento Bacteriano Frente a Antimicrobianos Conhecidos

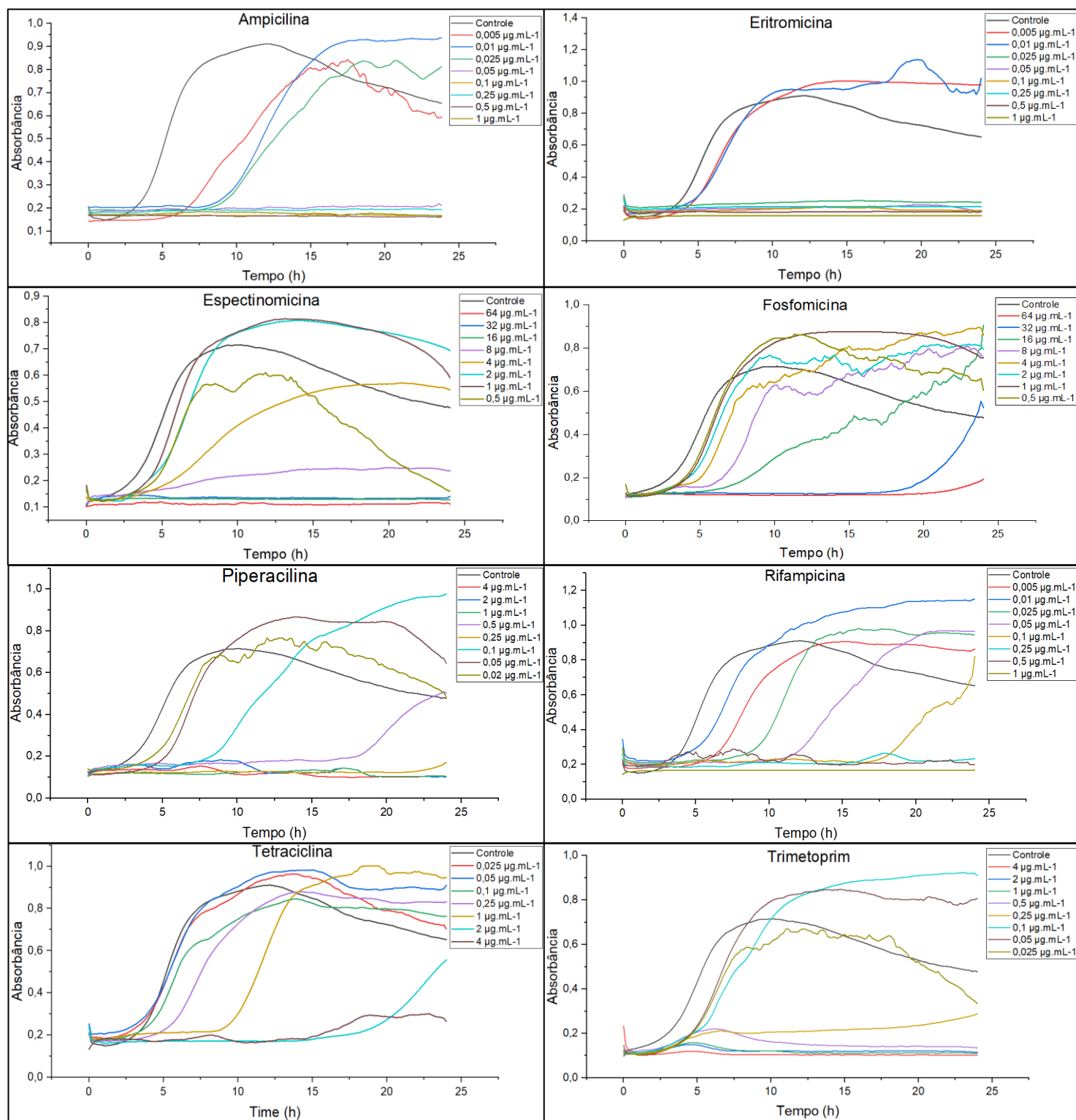
Quando se trata da triagem de extratos de produtos naturais em modelo de HTS, a ampla faixa de concentrações dos compostos nas amostras representa um desafio para a detecção de bioatividade usando ensaios biológicos (Bugni *et al*, 2008). Compostos presentes em baixas concentrações em extratos brutos podem não ser detectados em bioensaios de atividade antimicrobiana tradicionais. Nesse sentido, primeiramente foram feitas as análises da cinética de crescimento bacteriano frente a diferentes concentrações de antibióticos, a fim de observar como concentrações inferiores à mínima inibitória (MIC) iriam influenciar o crescimento bacteriano ao longo das 24 horas.

Foram utilizados nove antimicrobianos conhecidos, sendo eles amoxicilina, ampicilina, eritromicina, espectinomicina, fosfomicina, piperacilina, rifampicina, tetraciclina e trimetoprim. Estes compostos foram selecionados de forma a incluir representantes de diferentes classes e mecanismos de ação nos experimentos. Dentre as classes dos antibióticos escolhidas temos os macrolídeos, beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, rifamicinas, tetraciclina e aminopirimidínicos. Em relação às cepas bacterianas, foi selecionada uma linhagem Gram-positiva *Bacillus subtilis* PY79 e uma Gram-negativa *Escherichia coli* ATCC 25922.

Como resultado desses experimentos, obtiveram-se gráficos que apresentam a variação do crescimento bacteriano ao longo das 24 horas quando expostos a diferentes concentrações de cada antimicrobiano.

4.1.1 *Bacillus subtilis*

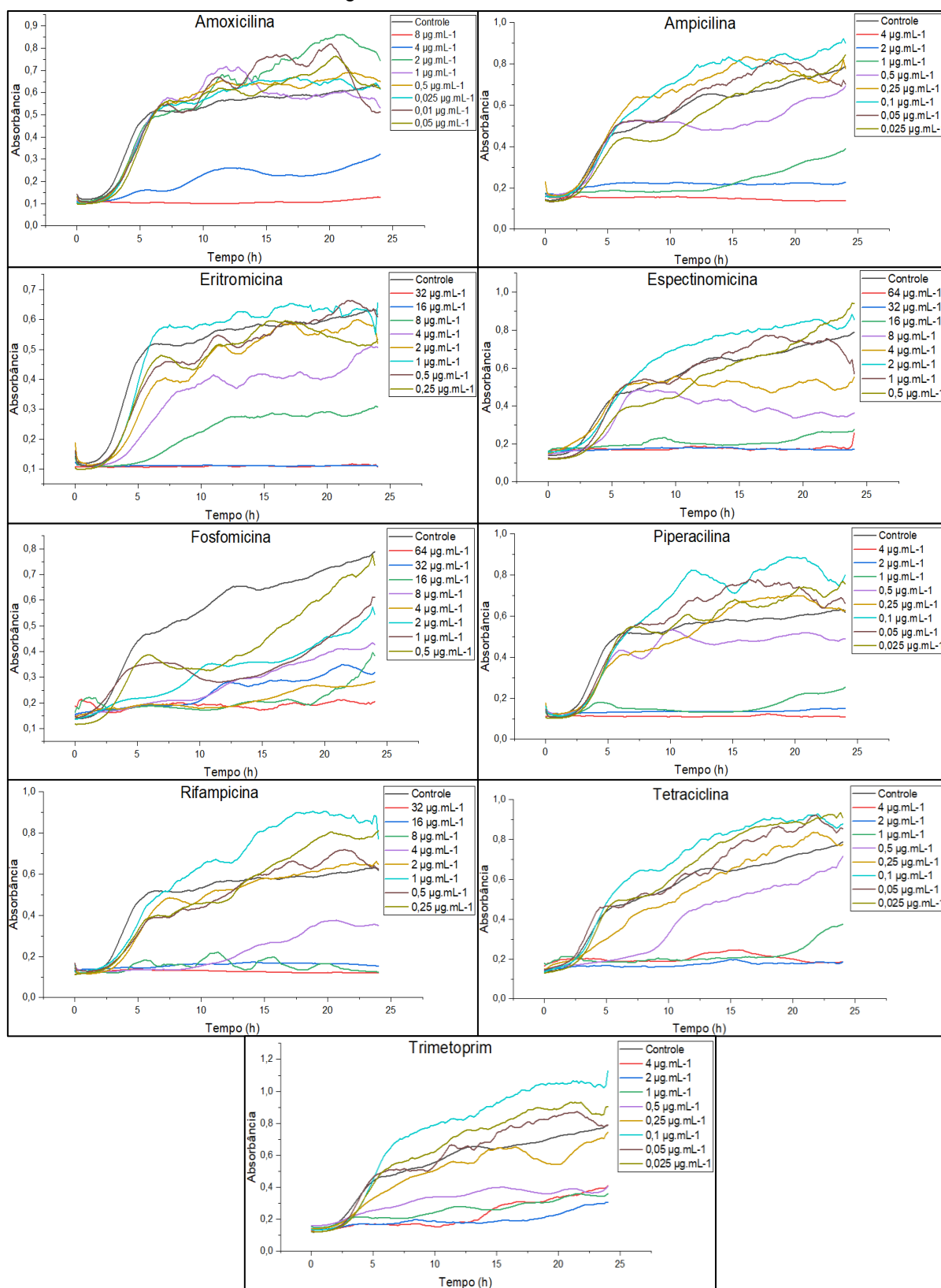
Figura 1: Curvas de crescimento de *Bacillus subtilis* frente a diferentes concentrações de antimicrobianos ao longo de 24 horas.



Fonte: Leonardo de Faria Figueiredo, 2023 (autoral)

4.1.2 *Escherichia coli*

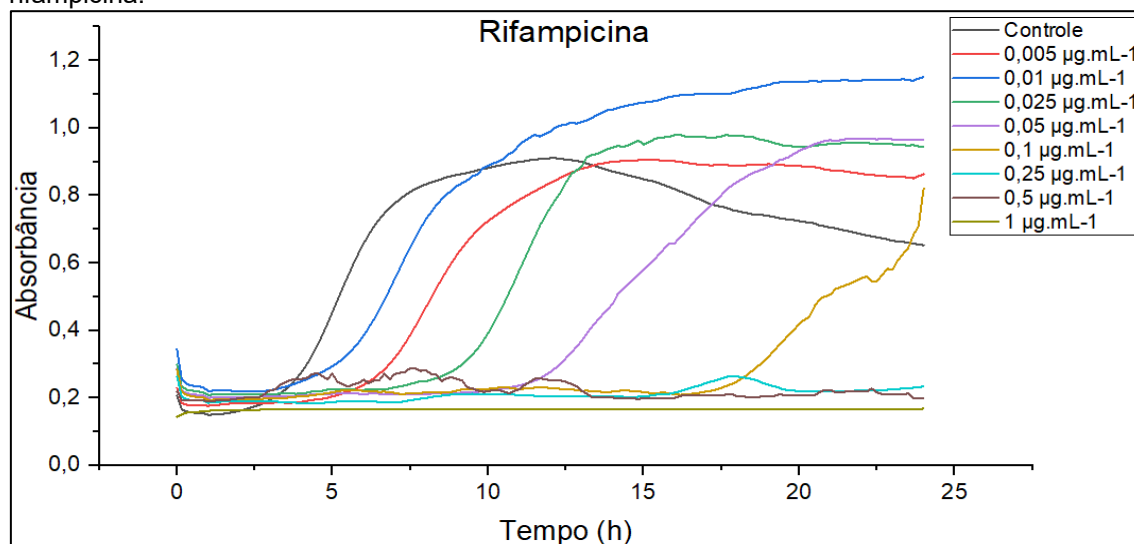
Figura 2: Curvas de crescimento de *Escherichia coli* frente a diferentes concentrações de antimicrobianos ao longo de 24 horas.



Fonte: Leonardo de Faria Figueiredo, 2023 (autorial)

Através dos gráficos, é possível observar que concentrações mínimas de antibióticos ainda são capazes de afetar o crescimento, seja atrasando a fase log de crescimento ou diminuindo a inclinação da curva. Estes fenômenos são melhor ilustrados na análise de crescimento de *B. subtilis* frente à rifampicina (Figura 1; Gráfico 1).

Gráfico 1: Curvas de crescimento de *Bacillus subtilis* frente a diferentes concentrações de rifampicina.



No gráfico podemos observar que, apesar do fato de $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de rifampicina ter sido a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano completamente, concentrações até 50 vezes menores ($0,005 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foram capazes de impactar o crescimento consideravelmente, levando ao atraso gradual do início da fase log quando comparadas ao controle.

Antibióticos em concentrações baixas influenciam a cinética de crescimento bacteriano nas primeiras horas do bioensaio, tendo sua inibição superada até o fim do experimento. Em J. Chadha (2021) é descrito que concentrações inferiores ao MIC ainda são capazes de comprometer significativamente o crescimento bacteriano, aumentando a mortalidade e comprometendo a formação de biofilme. Esse fenômeno foi melhor observado nas análises com *B. subtilis*, sendo menos acentuado com *E. coli*, apesar de ainda presente, como pode ser observado na análise de crescimento de *E. coli* frente ao trimetoprim (Figura 2).

Para explicar este efeito observado nas primeiras horas do bioensaio, propõe-se a hipótese de que a sensibilidade bacteriana aos antibióticos está relacionada ao seu estado metabólico e taxa de crescimento. Eng *et al.* (1991) realizaram experimentos com a finalidade de explorar como cepas bacterianas, Gram-positivas e Gram-negativas, responderiam a diferentes antimicrobianos em concentrações variadas de nutrientes. No cultivo em meio pobre, o efeito bactericida observado foi mínimo, somente fluoroquinolonas obtiveram efeito considerável. Já em condições subótimas, foi observada boa atividade antimicrobiana, entretanto alguns compostos ainda apresentaram atividade inferior àquela observada em meio rico em nutrientes, indicando que a sensibilidade bacteriana está relacionada à disponibilidade de nutrientes e à taxa de crescimento de sua população.

Stokes *et al.* (2019) fizeram uma revisão bibliográfica a fim de analisar a relação entre o metabolismo bacteriano e a eficácia dos antibióticos. Nesse artigo é descrito que, de modo geral, o efeito de antibióticos bactericidas se daria por meio de dano a macromoléculas intracelulares, induzindo a uma resposta na forma de estresse (como estresse oxidativo por radicais livres) e atividade metabólica elevada, levando à morte celular. Em contrapartida, antimicrobianos bacteriostáticos teriam sua atividade estabelecida através da redução do metabolismo bacteriano, agindo em mecanismos como os de tradução e redução da taxa de respiração celular.

Baquero e Levin (2021) discutem os fatores que influenciam a farmacodinâmica e farmacocinética da ação de antibióticos. No artigo é estabelecido que, em geral, a taxa de morte celular é proporcional à taxa de crescimento máxima de sua população. Considerando que a fase log é o momento em que a taxa de crescimento bacteriano é máxima, podemos explicar a maior sensibilidade identificada durante as primeiras horas de bioensaio, incluindo o atraso do crescimento e diminuição da inclinação.

A redução da inclinação da curva e crescimento bacteriano observados corroboram com os resultados apresentados por Lourenço e Pinto (2011). No artigo, foram feitos experimentos de análise de crescimento bacteriano análogos aos realizados no presente trabalho, concluindo-se que a taxa de crescimento

bacteriano e inclinação da curva de crescimento são inversamente proporcionais à concentração de antimicrobianos presentes no meio de cultivo. Em Theophel *et al*, (2014), ainda é relatado que a duração da fase lag de crescimento, e ocorrência da fase log, podem ser indicadores mais significativos da ocorrência atividade antimicrobiana. Nesse sentido, a análise do padrão de crescimento bacteriano ao longo do período do bioensaio pode ser utilizada como uma ferramenta na determinação da presença de compostos antimicrobianos em baixas concentrações, como os presentes em extratos biológicos.

4.2 Fracionamento

Foram fracionados extratos das linhagens CCIBt3551, CCIBt3265, CCIBt3320, CCIBt 3214, CCIBt 3496, CCIBt 3338, CCIBt 3307, CCIBt 3275 e CCIBt 3329. A partir de cada extrato, foram obtidas 7 frações. A última fração (F7) é feita para a limpeza da coluna de fracionamento e não é testada em ensaios biológicos. A massa dos extratos e suas frações foram dispostas no Quadro 2.

Quadro 2 – Rendimento do fracionamento de extratos de cianobactérias

Linhagem	Extrato (mg)	F1 (mg)	F2 (mg)	F3 (mg)	F4 (mg)	F5 (mg)	F6 (mg)	F7 (mg)	Rendimento
CCIBt3551	162,1	58,7	5,8	7,9	9,3	19,8	8,7	5,9	72%
CCIBt3320	92,5	20,0	3,9	7,8	7,8	12,9	7,6	9,6	75%
CCIBt3265	67,4	19,7	6,1	7,5	5,9	9,8	7,5	8,6	97%
CCIBt3214	178,8	12,3	2,2	2,9	7,0	3,8	2,6	3,5	40%
CCIBt3496	112,0	17,0	11,1	5,0	5,6	4,8	2,5	4,4	59%
CCIBt3338	117,9	29,8	5,2	5,5	8,5	11,5	0,9	8,0	78%
CCIBt3307	67,8	22,0	0,9	2,4	6,5	6,5	3,1	23,4	79%
CCIBt3275	113,1	15,6	7,4	7,0	7,1	6,4	4,7	6,0	63%
CCIBt3329	60,0	26,8	6,5	5,0	7,7	7,8	3,8	4,7	79%

Fonte: Leonardo de Faria Figueiredo, 2023 (autoral)

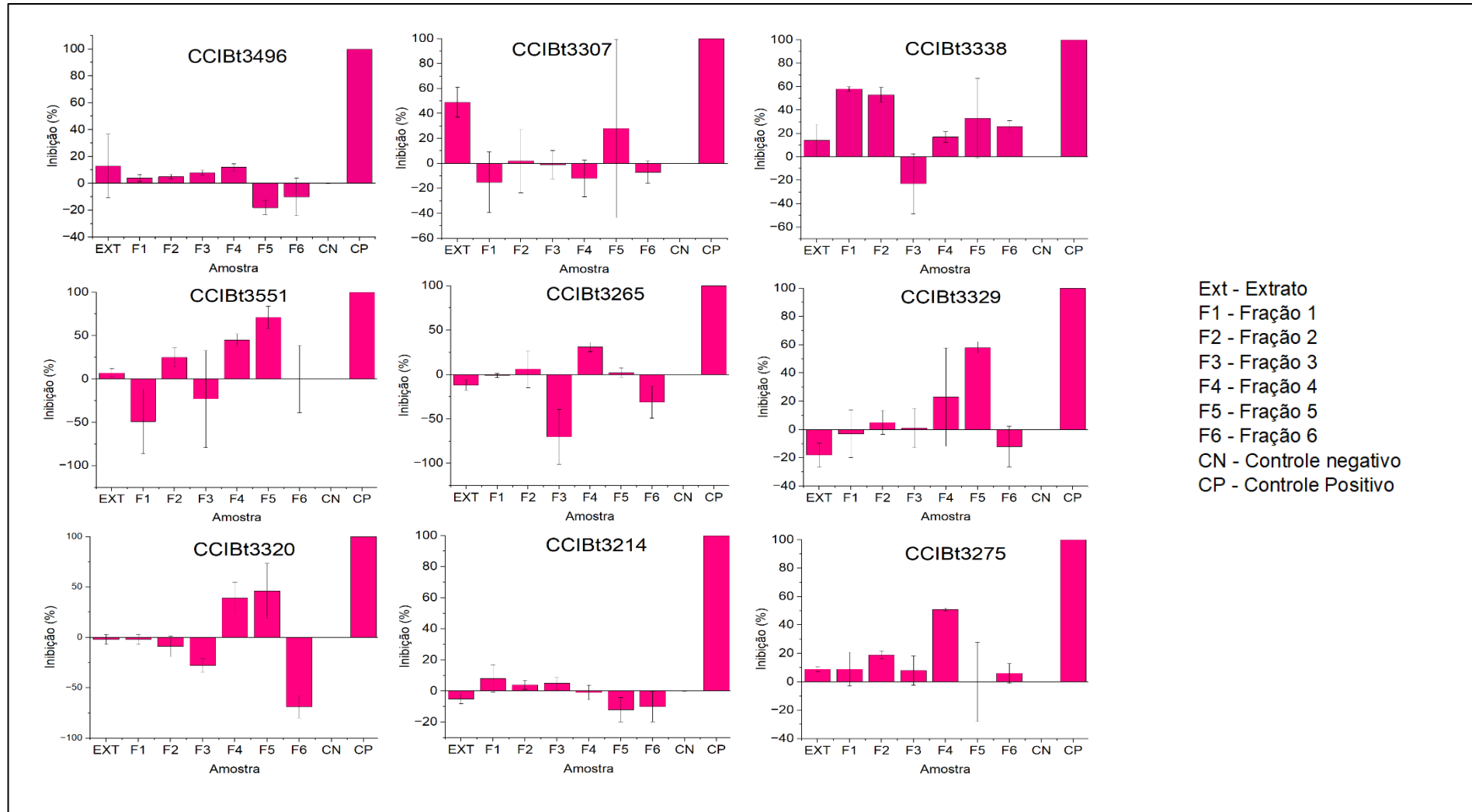
Os fracionamentos realizados foram eficientes, sendo que seis dos nove extratos fracionados atingiram um rendimento maior que 70% para o processo. Excepcionalmente as linhagens CCIBt3214, CCIBt3496 e CCIBt3275 apresentaram um menor rendimento, o que pode ser justificado por desvios

experimentais ou, até mesmo, por características intrínsecas dos extratos utilizados.

4.3 Bioensaios com Extratos e Frações

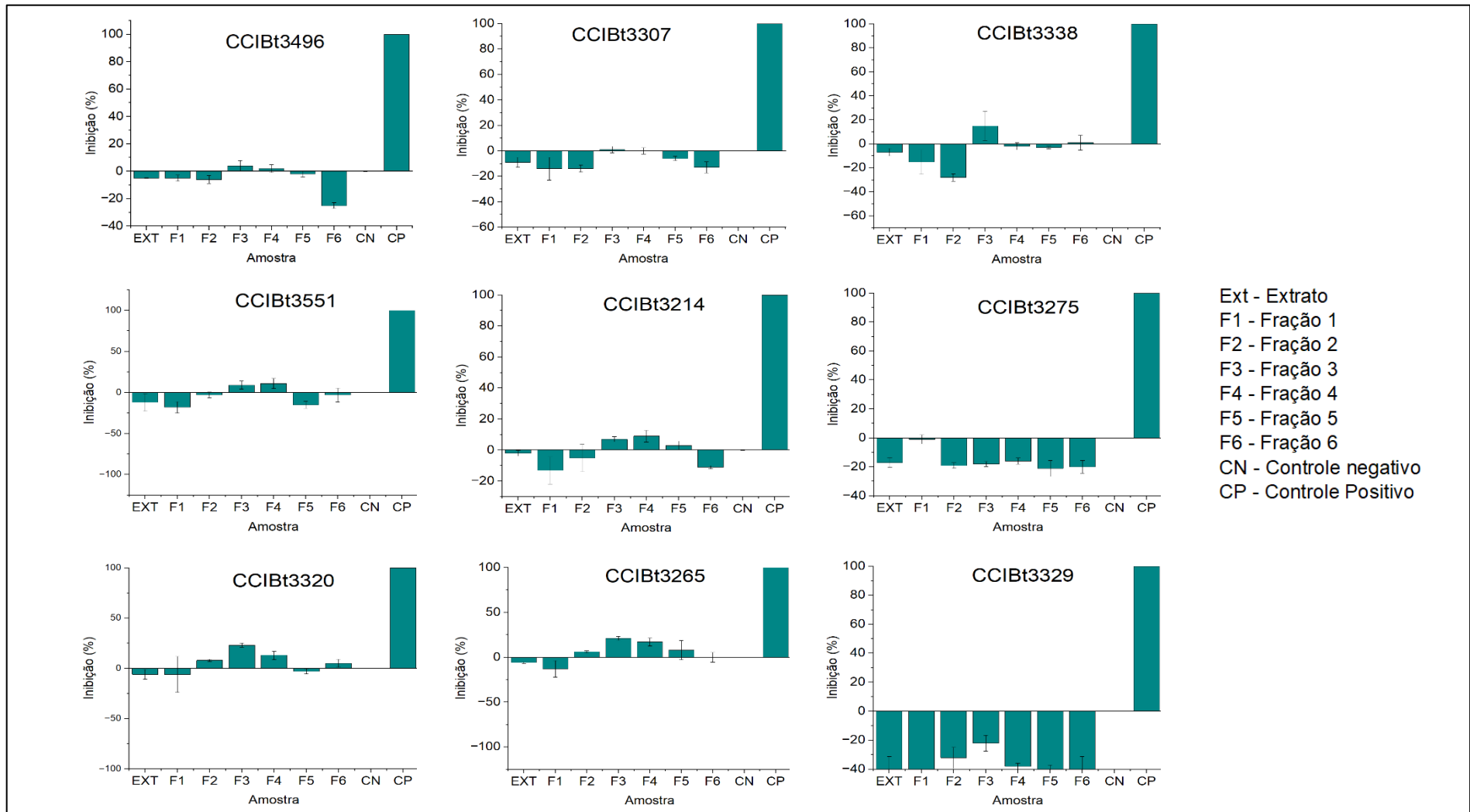
As análises dos extratos e frações das nove linhagens de cianobactérias foram realizadas frente à *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis* seguindo a mesma metodologia que os ensaios de crescimento bacteriano, sendo analisadas após o intervalo de 24 horas, com a utilização de controle positivo e negativo. Nas Figuras 3 e 4, estão dispostos os gráficos de porcentagem de inibição de cada linhagem, frente a *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*.

Figura 3: Porcentagem de inibição de crescimento de *Bacillus subtilis* frente a diferentes extratos e frações cianobacterianos.



Fonte: Leonardo de Faria Figueiredo, 2023 (autoral)

Figura 4: Porcentagem de inibição de crescimento de *Escherichia coli* frente a diferentes extratos e frações cianobacterianos



Fonte: Leonardo de Faria Figueiredo, 2023 (autoral)

Os valores das porcentagens de inibição e desvios padrões estão disponíveis no **Anexo A**.

Considerando um mínimo de 50% de inibição para uma amostra ser considerada positiva, foram identificadas amostras com potencial atividade antimicrobiana nas linhagens CCIBt3338, CCIBt3551, CCIBt3329 e CCIBt3275, frente a *B. subtilis*. Já quando se tratam das análises frente a *E. coli*, nenhuma amostra demonstrou atividade considerável. É importante mencionar que a presença da membrana externa em bactérias Gram-negativas, como a *Escherichia coli*, é um fator intrínseco de resistência à ação de compostos antimicrobianos (Vaara M, 1992), corroborando com os resultados de maior susceptibilidade de *B. subtilis* em relação à *E. coli*, observado também nos experimentos utilizando antibióticos conhecidos (Figuras 1 e 2).

Analisando os resultados dos ensaios frente a *B. subtilis*, verifica-se a ocorrência de desvios padrões mais altos. Tendo em vista que esse fenômeno não foi constatado nos experimentos utilizando antibióticos conhecidos, pode-se propor que seja uma consequência da triagem dos extratos e frações.

No que tange a metodologia dos bioensaios, em Jonkers *et al.* (2020) é descrito o uso de *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli* na análise de atividade antimicrobiana de amostras aquáticas em modelo de HTS. Nesses experimentos, as placas analisadas foram cultivadas a 37 °C sob agitação constante, sendo testadas frente à extratos de efluentes hospitalares. Ainda no artigo, é relatada a dificuldade de diferenciar falsos positivos, visto que a presença de compostos orgânicos causaria comprometimento da integridade da membrana celular. Quando observamos que 4 das 9 linhagens testadas apresentaram ao menos uma amostra com inibição de crescimento bacteriano superior a 50%, é apontado que a complexidade química dos extratos e frações de cianobactérias analisados possa ser um fator para a ocorrência de falsos positivos nos experimentos realizados com *Bacillus subtilis*.

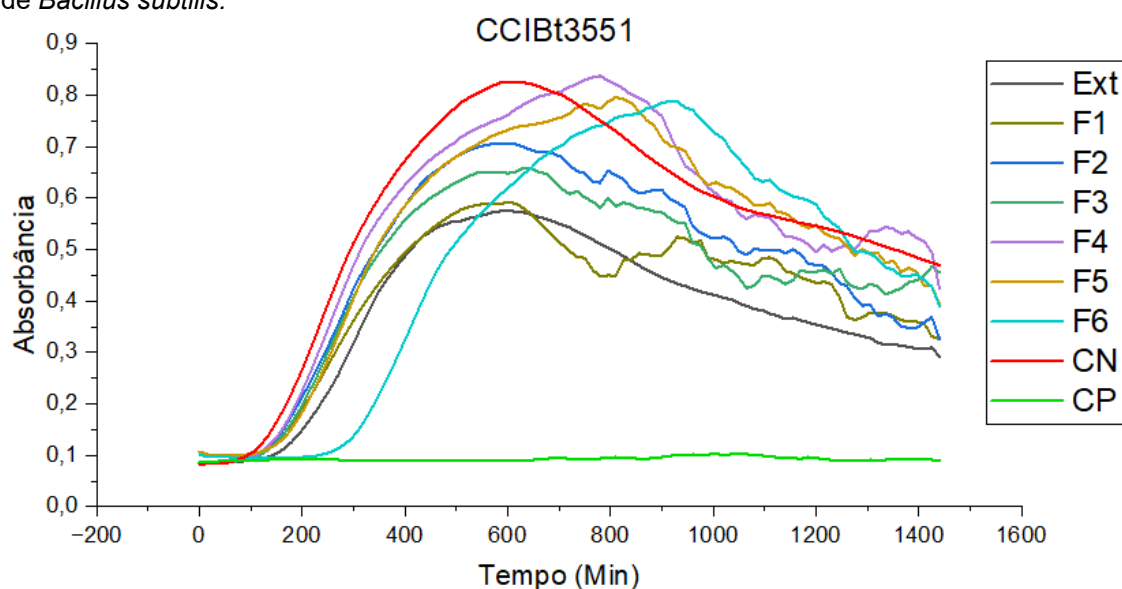
Quanto aos ensaios de extratos e frações frente à *E. coli*, foi constatada a baixa incidência de atividade antimicrobiana. Os desvios padrões obtidos nas análises utilizando amostras de cianobactérias foram similares àqueles observados nas análises frente a antibióticos conhecidos.

4.4 Linhagens CCIBt3551 e CCIBt3265

A fim de elucidar como os extratos e frações de cianobactérias influenciam o crescimento bacteriano, foram realizados experimentos utilizando as amostras das linhagens CCIBt3551 e CCIBt3265 frente a *Bacillus subtilis*. A linhagem CCIBt3551 foi selecionada pois foi considerada potencialmente bioativa pelo resultado da fração F5, enquanto a CCIBt3265 foi escolhida por não apresentar atividade antimicrobiana considerável em nenhuma fração na etapa de triagem (Figura 3). As análises foram realizadas seguindo a mesma metodologia dos experimentos com os antibióticos conhecidos, sendo incubadas a 37 °C ao longo de 24 horas com leituras automáticas em intervalos de 10 minutos.

Também foi realizado um experimento com a linhagem CCIBt3265 adicionada de 4 µg.mL⁻¹ de tetraciclina, com a finalidade de observar como a matriz do extrato e das frações poderia influenciar a atividade do antimicrobiano.

Gráfico 2: Influência do extrato e das frações da linhagem CCIBt3551 no perfil de crescimento de *Bacillus subtilis*.



Fonte: Leonardo de Faria Figueiredo, 2023 (autoral)

No Gráfico 2, observa-se que o extrato e frações da linhagem CCIBt 3551 exerceram influência sob o crescimento bacteriano. Nas análises com o Extrato e Fração 1 (F1) podemos observar, respectivamente, 47% e 38% de inibição no tempo de 24 horas. Já quando comparamos a curva de crescimento na presença da fração 6 (F6) em relação ao controle positivo, podemos identificar

o atraso da ocorrência da fase log de crescimento, o que é um possível indicador da presença de antimicrobianos em baixas concentrações. Entretanto, o fato de nenhuma das amostras apresentar inibição superior a 50% do crescimento nesse experimento, reduz o interesse nessa linhagem para a bioprospecção de possíveis antimicrobianos.

Gráfico 3: Influência do extrato e das frações da linhagem CCIBt3265 no perfil de crescimento de *Bacillus subtilis*.

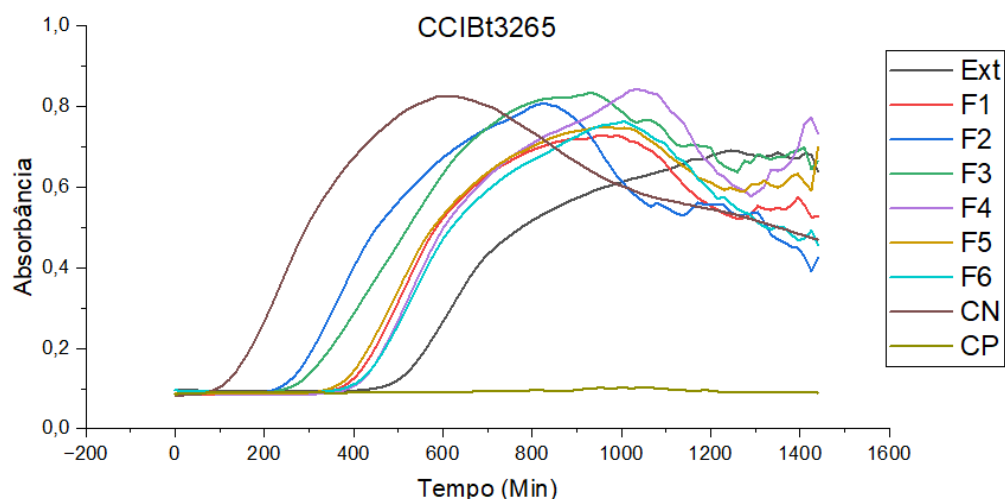
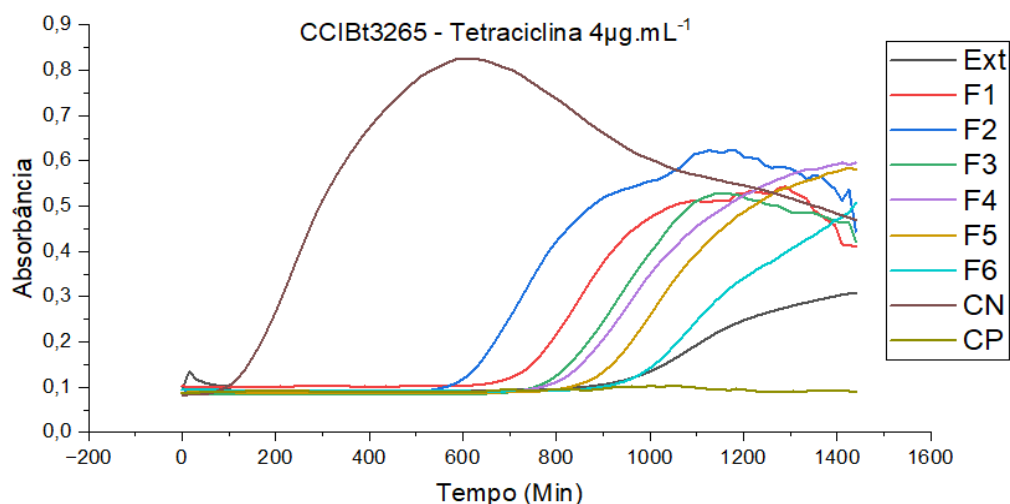


Gráfico 4: Influência do extrato e das frações da linhagem CCIBt3265 enriquecidas com tetraciclina $4\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ no perfil de crescimento de *Bacillus subtilis*.



No Gráfico 3, observa-se que nenhuma amostra da linhagem CCIBt3265 apresentou inibição considerável ($> 50\%$) do crescimento bacteriano, o que era esperado de acordo com os resultados obtidos na etapa de triagem inicial.

Entretanto, é possível identificar um atraso considerável do início da fase log de crescimento como consequência da exposição às frações e ao extrato.

No Gráfico 4, temos dispostas as curvas de crescimento de *B. subtilis* na presença das amostras da linhagem CCIBt3265 enriquecidas com uma concentração de 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de tetraciclina. Neste experimento, a concentração de tetraciclina utilizada no controle positivo foi a mesma utilizada no crescimento em conjunto com as amostras. A presença do extrato e frações impactou negativamente a ação inibitória da tetraciclina sob o crescimento bacteriano, visto que o crescimento foi consideravelmente superior na presença das amostras, o que é um indicativo da presença de compostos interferentes no bioensaio. É importante destacar que a presença da tetraciclina nas análises intensificou o atraso da fase log, fenômeno já observado no perfil de crescimento de *B. subtilis* frente somente às amostras (extratos e frações) da linhagem CCIBt3265 (Gráfico 3).

Os resultados dispostos nos Gráficos 3 e 4 demonstram que, apesar das amostras da linhagem CCIBt3265 não apresentarem inibição considerável no bioensaio, elas impactaram o crescimento microbiano através do atraso da fase log e da redução da inclinação da curva, o que pode ser um indicativo da presença de compostos de interesse. A utilização das curvas de crescimento bacteriano nestes experimentos é um exemplo de como essa prática pode complementar os resultados das análises com bioensaios tradicionais, fornecendo mais informações a respeito do padrão de inibição das amostras.

Dentro do contexto dos avanços nas técnicas de HTS e os respectivos ensaios biológicos aplicáveis, a presença de compostos interferentes em amostras biológicas vem sendo averiguada (Bisson *et al*, 2016). Compostos com baixa seletividade e ação promíscua têm representado um obstáculo na bioprospecção de produtos naturais (Baell e Nissink, 2017).

Os chamados *pan-Assay interference compounds* (PAINs) são descritos inicialmente em Baell e Holloway (2010) como sendo compostos com bioatividade em múltiplos ensaios, possuindo baixa seletividade e, na maior parte dos casos, não sendo de interesse para o desenvolvimento de novos fármacos. Estes compostos carregam estruturas problemáticas, que não estão

incluídas nos filtros tradicionais de bases de dados (Bisson *et al*, 2016). Alguns exemplos identificados pelos autores são rhodoninas, quinonas, benzofuranos, catecois e 2-amino-carboniltiofenos (Bisson *et al*, 2016).

Os mecanismos de interferência são variados, dependendo de cada molécula e metodologia do bioensaio realizado. Falsos positivos podem ocorrer devido à uma grande quantidade de fatores como a formação de agregados proteicos e micelas, presença de pigmentos que influenciem na leitura, presença de compostos fluorescentes e reatividade da amostra analisada (Nissink e Blackburn, 2014). O grau de pureza e a complexidade nata das matrizes biológicas analisadas também são apontados como obstáculos na bioprospecção de produtos naturais (Bisson *et al*, 2016).

Algumas metodologias são sugeridas para contornar a problemática da presença dos PAINs em ensaios de HTS. A combinação de filtros de subestruturas moleculares e bancos de dados com técnicas de desreplicação, através de abordagens com espectro de massas MS/MS e programas como SIRIUS, GNPS e NRPro, tem se mostrado como a principal estratégia para otimizar o processo de bioprospecção em relação aos PAINs e redescoberta de compostos já elucidados (Gaudêncio *et al*, 2023).

A utilização de estratégias de pré-fracionamento dos extratos e realização da curva de crescimento bacteriano empregados neste trabalho se demonstraram capazes de contribuir positivamente para a eficácia dos bioensaios. Através do pré-fracionamento, os extratos foram divididos em frações de menor complexidade, concentrando os compostos de interesse e separando possíveis interferentes. Já nos experimentos realizados com as linhagens CCIBT3551 e CCIBT3265 (gráficos 3 e 4) foi possível utilizar a curva cinética de crescimento como uma ferramenta na identificação de possíveis amostras de interesse, permitindo a melhor visualização do padrão de inibição das amostras.

5. Conclusão

A determinação da cinética de crescimento bacteriano, frente a antibióticos conhecidos, permitiu concluir que antimicrobianos em concentrações inferiores à concentração mínima inibitória (MIC) ainda são capazes de impactar consideravelmente o perfil de crescimento bacteriano, levando a alterações na fase log e inclinação da curva de crescimento. Desta forma, a curva cinética de crescimento bacteriano pode ser utilizada como uma ferramenta na triagem de extratos biológicos para atividade antimicrobiana, visando a determinação da presença de antimicrobianos em concentrações inferiores ao MIC.

O método de fracionamento utilizado se mostrou eficaz, considerando que 6 das 9 linhagens fracionadas apresentaram um rendimento do processo acima de 70%. Também é constatado que o fracionamento contribui positivamente para os bioensaios, separando os compostos e concentrando-os em frações de interesse.

Quanto aos ensaios biológicos, foram identificadas amostras potencialmente bioativas somente frente a *Bacillus subtilis*. A presença de interferentes ainda se mostrou um desafio para a bioprospecção destas amostras. Como próximos passos para estas análises, sugere-se que as frações potencialmente bioativas sejam direcionadas para o processo de fracionamento bioguiado e desreplicação.

6. Referências

BAELL, J. B. E HOLLOWAY, G. **New Substructure Filters for Removal of Pan Assay Interference Compounds (PAINS) from Screening Libraries and for Their Exclusion in Bioassays.** Journal of medical Chemistry, 2010.

BAELL, J. B. E J. WILLEM M. NISSINK. **Seven Year Itch. Pan-Assay Interference Compounds (PAINS) in 2017 - utility and limitations.** ACS Chemical Biology, 2017.

BAELL, J. B. **Feeling Nature's PAINS: Natural Products, Natural Product Drugs, and Pan Assay Interference Compounds (PAINS).** Journal of Natural Products, 2015.

BISSON, J; MCALPINE, J. B; FRIESEN, J. B; CHEN, S.-N; GRAHAM, J; PAULI, G. F. **Can Invalid Bioactives Undermine Natural Product-Based Drug Discovery?** Journal of Medicinal Chemistry, v. 59, n. 5, p. 1671–1690, 2016.

BUGNI, T; HARPER, M; MCCULLOCH, M; REPPART, J; IRELAND, C. **Fractionated Marine Invertebrate Extract Libraries for Drug Discovery.** Molecules, v. 13, n. 6, p. 1372–1383, 2008.

CARPINE, R. E SIEBER S. **Antibacterial and antiviral metabolites from cyanobacteria: Their application and their impact on human health.** Elsevier, 2021.

CHLIPALA, G. E; MO, S; ORJALA, J. **Chemodiversity in freshwater and terrestrial cyanobacteria - a source for drug discovery.** Current drug targets, v. 12, n. 11, p. 1654–1673, 2011.

CLARDY, J; WALSH, C. **Lessons from natural molecules.** Nature, v. 432, n. 7019, p. 829–837, 2004.

CORNELIA B., NATION ROGER L. **Limitations of Antibiotic MIC-Based PK-PD Metrics: Looking Back to Move Forward,** Frontiers in Pharmacology Volume 12, 2021.

COVINGTON, B. C; MCLEAN, J. A; BACHMANN, B. 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.

CRAGG, G. M; NEWMAN, D. J. **Natural products: A continuing source of novel drug leads.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, 2013.

CRNKOVIC, C. M. **Metabolomics for the Discovery of Natural Products from Cyanobacteria,** University of Illinois at Chicago, Thesis, 2018

DAMAZIO, C. **Cianobactérias em esteiras microbianas coliformes da lagoa Pitanguinha, Rio de Janeiro, Brasil.** Revista Brasileira de Paleontologia, v. 9, n. 1, p. 165–170, 2006.

ENG, R. H. K; PADBERG, F. T; SMITH, S. M; TAN, E. N; AND CHERUBIN, C. E. **Bactericidal effects of antibiotics on slowly growing and nongrowing bacteria,** American Society of Microbiology, 1991.

FALLARERO, A; HANSKI, L; VUORELA, P. **How to Translate a Bioassay Into a Screening Assay for Natural Products: General Considerations and Implementation of Antimicrobial Screens.** Planta Medica, v. 80, n. 14, p. 1182–1199, 2014.

GAUDÊNCIO, S. P; PEREIRA, F. **Dereplication: racing to speed up the natural products discovery process.** Nat. Prod. Rep., v. 32, n. 6, p. 779–810, 2015.

HARVEY, A. L; EDRADA-EBEL, R; QUINN, R. J. **The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era.** Nature Reviews Drug Discovery, v. 14, n. 2, p. 111–129, 2015.

HUTCHINGS, M; TRUMAN, A; WILKINSON, B. **Antibiotics: past, present and future Current Opinion in Microbiology.** Elsevier Ltd, 2019.

J WILLEM, M NISSINK E SAM BLACKBURN. **Quantification of frequent-hitter behavior based on historical high-throughput screening data.** Future Science Ltd, 2014.

J. CHADHA, **In vitro effects of sub-inhibitory concentrations of amoxicillin on physiological responses and virulence determinants in a commensal strain of Escherichia coli,** Journal of Applied Microbiology, Volume 131, Issue 2, 1 August 2021, Pages 682–694.

JENSEN, C; LI, H; VESTERGAARD, M; DALSGAARD, A; FREES, D; LEISNER, J. J. **Nisin Damages the Septal Membrane and Triggers DNA Condensation in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus.** Frontiers in Microbiology, v. 11, n. June, p. 1–8, 2020.

JONKERS, TIM H. J. **Development of a high-throughput bioassay for screening of antibiotics in aquatic environmental samples.** Science of the Total Environment 729, 2020

KEHR, J. C; PICCHI, D. G; DITTMANN, E. **Natural product biosyntheses in cyanobacteria: A treasure trove of unique enzymes.** Beilstein Journal of Organic Chemistry, v. 7, n. Figure 1, p. 1622–1635, 2011.

KOEHN, F. E; CARTER, G. T. **The evolving role of natural products in drug discovery.** Nature Reviews Drug Discovery, v. 4, n. 3, p. 206–220, 2005.

LI, F; WANG, Y; LI, D; CHEN, Y; DOU, Q. P. **Are we seeing a resurgence in the use of natural products for new drug discovery?** Expert Opinion on Drug Discovery, v. 14, n. 5, p. 417–420, 2019.

LI, J. W. H; VEDERAS, J. C. **Drug discovery and natural products: End of era or an endless frontier?** Science, v. 325, n. 5937, p. 161–165, 2009.

LIU, H.-W. (BEN); MANDER, L. **Comprehensive Natural Products II.** Oxford: Elsevier, 2010. p. 141–188.

MENEZES, M; BICUDO, C. E. M; MOURA C. W. N. **Update of the Brazilian floristic list of Algae and Cyanobacteria.** Rodriguésia, 2015.

MOSTAFA, A. E RANJBAR, R. **Antimicrobial Resistance Collaborators (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis** Evidence-Based Nursing Published Online First: 27 July 2023. doi: 10.1136/ebnurs-2022-103540

NEWMAN, D. J; CRAGG, G. M. **Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019.** Journal of Natural Products, v. 83, n. 3, p. 770–803, 2020.

OLIVA, A; FURUSTRAND TAFIN, U; MAIOLO, E. M; JEDDARI, S; BÉTRISEY, B; TRAMPUZ, A. **Activities of Fosfomycin and Rifampin on Planktonic and Adherent Enterococcus faecalis Strains in an Experimental Foreign-Body Infection Model.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 58, n. 3, p. 1284–1293, 2014.

P. GAUDÊNCIO, ENGIN BAYRAM, LADA LUKIĆ BILELA *et al.* **Advanced Methods for Natural Products Discovery: Bioactivity Screening, Dereplication, Metabolomics Profiling, Genomic Sequencing, Databases and Informatic Tools, and Structure Elucidation.** Marine Drugs, 2023.

PYE, C. R; BERTIN, M. J; LOKEY, R. S; GERWICK, W. H; LININGTON, R. G. **Retrospective analysis of natural products provides insights for future discovery trends.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 114, n. 22, p. 5601–5606, 2017.

SALVADOR-REYES, L. A; LUESCH, H. **Biological targets and mechanisms of action of natural products from marine cyanobacteria.** Nat. Prod. Rep., v. 32, n. 3, p. 478–503, 2015.

SANT'ANNA, CÉLIA LEITE; BRANCO, L. H. Z; GAMA JÚNIOR, W. A; WERNER, V. R. **Lista de Cyanobacterias do Estado de São Paulo.** Biota Neotropica, v. 11, n. suppl 1, p. 455–495, 2011.

SHIH, P. M. *et al.* **Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 110, n. 3, p. 1053– 1058, 2013.

SHISHIDO, T. K; POPIN, R. V; JOKELA, J; WAHLSTEN, M; FIORE, M. F; FEWER, D. P; HERFINDAL, L; SIVONEN, K. **Dereplication of Natural Products with Antimicrobial and Anticancer Activity from Brazilian Cyanobacteria**. *Toxins*, v. 12, n. 1, p. 12, 2019.

SILVA-STENICO, M. E; SILVA, C. S. P; LORENZI, A. S; SHISHIDO, T. K; ETCHEGARAY, A; LIRA, S. P; MORAES, L. A. B; FIORE, M. F. **Non-ribosomal peptides produced by Brazilian cyanobacterial isolates with antimicrobial activity**. *Microbiological Research*, v. 166, n. 3, p. 161– 175, 2011.

SINGH, R. K; TIWARI, S. P; RAI, A. K; MOHAPATRA, T. M. **Cyanobacteria: an emerging source for drug discovery**. *J. Antibiot.*, v. 64, n. 6, p. 401–412, 2011.

STOKES, M. J; LOPATKIN, A. J; LOBRITZ, M. A; COLLINS, J. J. **Bacterial Metabolism and Antibiotic Efficacy**, *Cell Metabolism*, Volume 30, 2ª edição, 2019, p. 251-259.

TAN, L. T. **Bioactive natural products from marine cyanobacteria for drug discovery**. *Phytochemistry*, v. 68, n. 7, p. 954–979, 2007.

TAWFIKE, A. F; VIEGELMANN, C; EDRADA-EBEL, R. **Metabolomics and Dereplication Strategies in Natural Products**. *Metabolomics Tools for Natural Product Discovery*. Totowa, NJ: Humana Press, 2013. p. 227–244.

THEOPHEL, K; SCHACHT, V. J; SCHLÄPFER, M; SCHNELL, S; STINGU, C.-S; SCHAUMANN, R; BUNGE, M. **The importance of growth kinetic analysis in determining bacterial susceptibility against antibiotics and silver nanoparticles**. *Frontiers in Microbiology*, v. 5, n. NOV, p. 1–10, 2014.

TIDGEWELL, K; CLARK, B. R; GERWICK, W. H. **The Natural Products Chemistry of Cyanobacteria**. *Comprehensive Natural Products II*, 2, 141-181, 2010.

VAARA M. **Agents that increase the permeability of the outer membrane**. *Microbiol Rev* 1992, 56:395-411

WOJNICZ. D. E TICHACZEK-GOSKA, D. **Effect of sub-minimum inhibitory concentrations of ciprofloxacin, amikacin and colistin on biofilm formation and virulence factors of Escherichia coli planktonic and biofilm forms isolated from human urine**. *Brazilian Journal of Microbiology* 44, 1, 259-265, 2013.

ZHANG, M. M; QIAO, Y; ANG, E. L; ZHAO, H. **Using natural products for drug discovery: the impact of the genomics era**. *Expert Opinion on Drug Discovery*, v. 12, n. 5, p. 475–487, 2017.

Anexo A

Bioensaios frente à *Bacillus subtilis*

Quadro 1 – Controles positivos e negativos para os ensaios de extratos e frações de cianobactérias contra *B. subtilis*

Controle	Tempo	Abs	EPM*	% de inibição
Negativo	24 horas	0,73	0,09	0
Positivo	24 horas	0,04	0,0007	100

* EPM = erro padrão da média

Fonte: Leonardo de Faria Figueiredo, 2023 (autoral)

Quadro 2: Porcentagem de inibição de extratos e frações de 9 linhagens de cianobactérias frente à *B. subtilis*, após o período de 24 horas.

Amostras	Média	EPM	Amostras	Média	EPM
CCIBt3496			CCIBt3307		
Ext	13	23,6	Ext	49	12,0
F1	4	2,5	F1	-15	24,3
F2	5	1,7	F2	2	25,5
F3	8	1,9	F3	-1	11,3
F4	12	2,7	F4	-12	14,8
F5	-18	5,4	F5	28	71,5
F6	-10	13,9	F6	-7	9,0
CCIBt3338			CCIBt3214		
Ext	14	13,9	Ext	-5	3,2
F1	58	1,9	F1	8	8,8
F2	53	6,5	F2	4	2,9
F3	-23	25,7	F3	5	4,0
F4	17	4,6	F4	-1	4,7
F5	33	34,3	F5	-12	7,9
F6	26	5,1	F6	-10	9,7
CCIBt3551			CCIBt3320		
Ext	7	4,8	Ext	-2	4,9
F1	-49	37,1	F1	-2	4,9
F2	25	11,0	F2	-9	10,3
F3	-23	55,9	F3	-28	6,7
F4	45	7,4	F4	39	15,8
F5	71	12,7	F5	46	27,5
F6	0	39,0	F6	-69	11,3
CCIBt3265			CCIBt3275		
Ext	-12	5,5	Ext	9	1,8
F1	-1	2,3	F1	9	11,8
F2	6	20,8	F2	19	2,7
F3	-70	30,9	F3	8	10,3
F4	31	5,1	F4	51	0,9
F5	2	5,2	F5	0	27,9
F6	-31	18,1	F6	6	7,1
CCIBt3329					
Ext	-18	8,5			
F1	-3	16,8			
F2	5	8,5			
F3	1	13,6			
F4	23	34,8			
F5	58	4,1			
F6	-12	14,4			

Fonte: Leonardo de Faria Figueiredo, 2023 (autoral)

Bioensaios frente à *Escherichia coli*

Quadro 5 – Controles positivos e negativos para os ensaios de extratos e frações de cianobactérias, em *E. coli*.

Controle	Tempo	Abs	EPM*	% de inibição
Negativo	24 horas	0,66	0,09	0
Positivo	24 horas	0,05	0,0008	100

* EPM = erro padrão da média

Fonte: Leonardo de Faria Figueiredo, 2023 (autoral)

Quadro 6 – Porcentagem de inibição de extratos e frações de 9 linhagens de cianobactérias frente à *E. coli*, após o período de 24 horas.

Amostras	Média	EPM	Amostras	Média	EPM
CCIBt3496			CCIBt3307		
Ext	-5	0,3	Ext	-9	3,9
F1	-5	2,3	F1	-14	9,0
F2	-6	3,0	F2	-14	2,8
F3	4	4,0	F3	1	2,5
F4	2	2,7	F4	0	2,5
F5	-2	2,2	F5	-6	1,6
F6	-25	2,2	F6	-13	4,4
CCIBt3338			CCIBt3214		
Ext	-7	3,1	Ext	-2	1,9
F1	-15	10,2	F1	-13	8,9
F2	-28	3,1	F2	-5	8,8
F3	15	12,3	F3	7	1,6
F4	-2	2,9	F4	9	3,8
F5	-3	1,1	F5	3	2,8
F6	1	6,2	F6	-11	1,1
CCIBt3551			CCIBt3320		
Ext	-12	10,8	Ext	-6	5,0
F1	-18	6,9	F1	-6	17,8
F2	-3	3,6	F2	8	1,1
F3	9	5,0	F3	23	2,0
F4	11	6,1	F4	13	4,1
F5	-15	4,3	F5	-3	2,5
F6	-3	8,6	F6	5	4,0
CCIBt3265			CCIBt3275		
Ext	-6	0,8	Ext	-17	3,2
F1	-13	9,2	F1	-1	3,0
F2	6	1,2	F2	-19	1,9
F3	21	2,1	F3	-18	1,8
F4	17	4,3	F4	-16	2,2
F5	8	10,6	F5	-21	5,5
F6	0	5,4	F6	-20	4,4
CCIBt3329					
Ext	-44	12,7			
F1	-43	2,9			
F2	-32	7,3			
F3	-22	5,4			
F4	-38	2,1			
F5	-45	7,9			
F6	-43	11,8			

Fonte: Leonardo de Faria Figueiredo, 2023 (autoral)

 21/Nov/2023
Data e assinatura do aluno

21/11/2023
Data e assinatura da orientadora