UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação química e biológica dos organismos marinhos cianobactéria *Cyanobium* sp. CENA139 e fungo endofítico T68

Gabriel Brolio Pavão

Ribeirão Preto
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação química e biológica dos organismos marinhos cianobactéria *Cyanobium* sp. CENA139 e fungo endofítico T68

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientado: Gabriel Brolio Pavão

Orientadora: Profa. Dra. Hosana Maria Debonsi

Ribeirão Preto
2016

PAVÃO, G. B.	**Avaliação química e biológica dos organismos marinhos cianobactéria *Cyanobium* sp. CENA139 e fungo endofítico T68**		**MESTRADO FCFRPUSP 2016**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Pavão, Gabriel Brolio

Avaliação química e biológica dos organismos marinhos cianobactéria *Cyanobium* sp. CENA139 e fungo endofítico T68. Ribeirão Preto, 2016.

70 p.: il.;

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Debonsi, Hosana Maria.

1.Cianobactérias. 2.Fungo endofítico. 3.Produtos naturais marinhos. 4.Co-cultura. 5.Micotoxina

Folha de Aprovação

Gabriel Brolio Pavão

Avaliação química e biológica dos organismos marinhos cianobactéria *Cyanobium* sp. CENA139 e fungo endofítico T68

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Hosana Maria Debonsi

Aprovado em: _____ de _____ de _____

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Agradecimentos

Agradeço e dedico essa dissertação à minha família, em especial minha mãe Sueli, meu irmão Rafael e minha cunhada Cissa pelo apoio incondicional, e pela compreensão e momentos de ausência.

Agradeço a Deus, pelo refúgio e amparo nos momentos mais difíceis, concedendo serenidade e sabedoria.

Às minhas grandes amigas de laboratório, Olívia, Lorene, Ezequiane, Verônica e Bianca, pela amizade, companheirismo, apoio, risadas e conselhos ao longos dos anos.

Aos amigos que a vida me deu e sempre me apoiaram ao longo do caminho, Ana Paula, Danilo, Otávio, Letícia e ao Vinícius, que nunca desistiram de me apoiar, mesmo nos momentos mais críticos.

Aos técnicos josé Carlos Tomaz, daniela Ricardo Engracia Caluz, Isabel Cristina Turatti, Maria Angélica Gelly, Vinícius Pararetti.

À professora Dr.a Lorena Rigo Gaspar Cordeiro, pela colaboração nos ensaios de fototoxicidade e às suas alunas Renata, Gabriela e Karen.

Aos professores Norberto Peporine Lopes e João Luis Caligari Lopes, pela oportunidade com a disciplina de Análise Orgânica no PAE e aos ensinamentos.

À minha orientadora, Profa. Dra. Hosana Maria Debonsi, pela orientação, amizade e confiança.

A faculdade de Ciências farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP pela oportunidade de realização deste mestrado.

À CAPES e CNPq pela bolsa concedida.

A FAPESP, pelo apoio financeiro.

Epígrafe

“Erros são, no final das contas, fundamentos da verdade. Se um homem não sabe o que uma coisa é, já é um avanço do conhecimento saber o que ele não é.”

Carl Jung

Resumo

PAVÃO, G. B. **Avaliação química e biológica dos organismos marinhos cianobactéria *Cyanobium* sp. CENA139 e fungo endofítico T68.** 2016. **N FOLHAS**. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Este trabalho teve como objetivo principal a avaliação dos perfis químico e biológico de duas linhagens de microrganismos marinhos, a cianobactéria do gênero *Cyanobium* sp. CENA139, proveniente dos manguezais da Ilha do Cardoso, do Estado de São Paulo e o fungo T68, pertencente à família Xylariaceae, isolado da alga vermelha *Bostrychia tenella*, proveniente dos costões rochosos da Praia Dura, no Estado de São Paulo. Para atingir este objetivo, foram realizados culturas isoladas dos microrganismos e a co-cultura entre o fungo T68 e a cianobactéria CENA139; técnicas de extração por partição volume/volume; métodos cromatográficos como cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), bem como técnicas espectroscópicas e espectrométricas de RMN 1-D e 2-D, CL-EM, CG-EM, além de desreplicação (utilizando o banco de dados MarinLit® e o Dicionário de Produtos Naturais. Foram isoladas três substâncias do fungo estudado: Esterigmatocistina, T68ARf60_a e T68ARf60_b. A micotoxina esterigmatocistina foi isolada também a partir da co-cultura entre o fungo e a cianobactéria. Este trabalho mostrou que houve interações ecológicas competitivas na cultura mista entre *Cyanobium* sp. CENA139 e o fungo T68, resultando na prevalência da cultura fúngica. Para finalizar, este trabalho avaliou a atividade biológica dos extratos brutos das culturas isoladas e co-cultura, não apresentando atividade antimicrobiana. Entretanto, o extrato bruto T68 mostrou-se fototóxico nos ensaios de fototoxicidade e a substância isolada esterigmatocistina foi citotóxica e fotoxóxica no mesmo ensaio, além de exercer citotoxicidade frente à linhagem tumoral HepG2 no ensaio de citotoxicidade MTT.

Palavras-chave: Cianobactérias. Fungo endofítico. Produtos naturais marinhos. Co-cultura. Micotoxina.

Abstract

PAVÃO, G. B. **Chemical and biological evaluation of marine organisms cyanobacteria *Cyanobium* sp. CENA139 and endophytic fungus T68.** 2016. **PAGES.** Dissertation (Master). School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto – University of São Paulo, 2016.

This study had as main objective the evaluation of the chemical and biological profiles of two strains of microorganisms, the cyanobacteria *Cyanobium* sp. CENA139, from Ilha do Cardoso mangroves, São Paulo State, and the endophytic fungus T68, Xylariaceae family, isolated from the red algae *Bostrychia tenella*, from the rocky shores at Praia Dura, São Paulo State. To accomplish this objective, we performed isolated cultures of the microorganisms and the co-culture between the fungus T68 and the cyanobacteria CENA139; partition extraction techniques; chromatographic methods such as thin layer chromatography and high performance liquid chromatography. Also, we performed spectroscopic and spectrometric techniques of NMR 1-D and 2-D, LC-MS, GC-MS, besides dereplication using data sources as MarinLit® and the Dictionary of Natural Products. Three compounds were isolated from the endophytic fungus culture: Sterigmatocystin, T68ARf60_a and T68ARf60_b. The mycotoxin sterigmatocystin was also isolated from the co-culture. This study showed that there was competitive ecological interactions between *Cyanobium* sp. CENA139 and the fungus T68 in the co-culture, resulting in the prevalence of the fungal culture. Finally, this study evaluated the biological potential of the crude extract from both isolated cultures and the co-culture, not exerting antimicrobial activity. Nevertheless, the T68 crude extract was shown to be phototoxic on the phototoxicity assays and the isolated sterigmatocystin was both cytotoxic and phototoxic in the same assay, besides exerting cytotoxicity on the tumor cell line HepG2 in the MTT assay.

Keywords: Cyanobacteria. Endophytic funghi. Marine natural products. Co-culture. Mycotoxin.

Lista de Figuras

Figura 1. Substâncias de origem marinha comercializadas com atividade antitumoral.

Figura 2. Toxinas encontradas em cianobactérias.

Figura 3. Substâncias isoladas de cianobactérias marinhas das espécies *Moorea producens* (1)*, Cyanobium sp*. (2).

Figura 4. Substâncias isoladas de cianobactérias marinhas com potencial anticancerígeno

Figura 5. Fluxograma de fracionamento e purificação dos extratos e frações do micro-organismo T68

Figura 6. Fluxograma de fracionamento e purificação dos extratos e frações da co-cultura T68C139.

Figura 7. Cromatograma obtido via análise em CLAE-DAD. Extrato bruto em meio arroz do fungo T68, λ = 254 nm.

Figura 8. Cromatograma obtido via análise em CLAE-DAD. Extrato bruto em meio arroz de *Cyanobium* sp. CENA139, λ = 254 nm.

Figura 9: Cromatograma obtido via análise em CLAE-DAD. Cultura mista em meio arroz do fungo T68 com *Cyanobium* sp. CENA139, λ = 254 nm.

Figura 10: Cromatograma obtido via análise em CLAE-DAD. Meio de cultura arroz, λ = 254 nm.

Figura 11: Sobreposição dos cromatograma obtidos via análise em CLAE-DAD. Em azul, extrato bruto em meio arroz do fungo T68; em roxo, extrato bruto em meio arroz de *Cyanobium* sp. CENA139; em verde, cultura mista em meio arroz do fungo T68 com *Cyanobium* sp. CENA139; em preto, meio de cultura arroz. λ = 254 nm.

Figura 12: Cromatograma obtidos via análise em CLAE-DAD da substância T68ARf33, λ = 254 nm.

Figura 13: Espectro de RMN de ^{1}H da substância T68ARf33, 500 MHz, solvente $CDCl_3$.

Figura 14: Espectro de RMN de ^{1}H expandido da substância T68ARf33, 500 MHz, solvente $CDCl_3$.

Figura 15: Espectro de RMN HSQC da substância T68ARf33, 500 MHz, solvente $CDCl_3$.

Figura 16: Espectro de RMN HSQC da substância T68ARf33, 500 MHz, solvente $CDCl_3$.

Figura 17: EM em alta resolução, obtido da substância T68ARf33, a partir do fungo T68. Em **(A)** full scan em modo positivo; em **(B)** full scan em modo negativo. *m/z* 324.

Figura 18: Estrutura química da micotoxina Esterigmatocistina.

Figura 19: Cromatograma obtido via análise semi-preparativa em CLAE-DAD da fração T68ARf60, λ = 254 nm.

Figura 20: EM em alta resolução, obtido da substância T68ARf60_a, a partir do fungo T68$[M+Na]^+$ *m/z* 487,1090 e $[2M+Na]^+$ *m/z* 951,2330.

Figura 21: EM em alta resolução, obtido da substância T68ARf60_b, a partir do fungo T68$[M+Na]^+$ *m/z* 470,1838 e $[2M+Na]^+$ *m/z* 917,3787.

Figura 22: EM em alta resolução, obtido da substância T68C139ARf56_a, a partir da co-cultura fungo T68 a cianobactéria CENA139. *m/z* 324.

Figura 23: Viabilidade celular de células 3T3 no ensaio de fotoxicidade, em **(A)** após tratamento com amostra T68ARf33 (0,1-100 µg/mL) e em **(B)** após tratamento com o extrato bruto em meio arroz do fungo T68. Nos gráficos, os pontos em azul representam os dados no ensaio em ausência de radiação ultravioleta (-UV), enquanto os pontos em amarelo representam o ensaio em presença de radiação ultravioleta (+UV.

Figura 24: Viabilidade celular de HepG2 no ensaio MTT após tratamento com amostra T68ARf33 (25-100 µg/mL). Dados: média ± DP de três experimentos independentes. *: diferente estatisticamente do grupo controle solvente dimetilsulfoxido (DMSO 1% V/V); # controle positivo metil metano sulfonato (MMS 200 µM) diferente estatisticamente do grupo controle negativo tampão fosfato (PBS); $p < 0,05$, ANOVA-Dunnett.

Lista de Tabelas

Tabela 1- Componentes do meio SWBG-11.

Tabela 2- Rendimento dos extratos brutos obtidos de cultura isolada e cultura mista das espécies *Cyanobium* sp. CENA139 e T68 em meio SWBG-11 e Arroz.

Tabela 3: Principais substâncias encontradas nas frações apolares do extrato T68 analisado via CG-EM, com similaridade maior que 90%, de acordo com o banco de dados do equipamento.

Tabela 4: Comparação espectroscópica entre amostra T68ARf33 e a micotoxina Esterigmatocistina.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 22

1.1 Cianobactérias.....24

1.2 Micro-organismos endofíticos 28

1.3 Co-cultivo entre cianobactéria e fungo 29

2 OBJETIVOS 32

3 MATERIAL E MÉTODOS 34

3.1 Material e equipamentos utilizados 35

3.2 Coleta, isolamento e identificação taxonômica das linhagens de cianobactérias 36

3.3 Obtenção da cultura do fungo Xylariaceae T68 38

3.4 Co-cultura de cianobactéria *Cyanobium* sp. CENA139 e fungo T68 ..... *39*

3.5 Extração, fracionamento e triagem química preliminar dos metabólitos ... 39

3.6 Avaliação das atividades biológicas dos extratos e frações 43

4. RESULTADOS e DISCUSSÃO..... 48

4.1 Triagem química preliminar 48

4.2 Análises em CG-EM 51

4.3 Isolamento e purificação dos metabólitos..... 52

4.4 Isolamento e identificação da fração T68C139ARf 60

4.5 Avaliação das atividades biológicas dos extratos e frações..... 61

5 CONCLUSÕES 64

REFERÊNCIAS 66

Introdução

– I –

INTRODUÇÃO

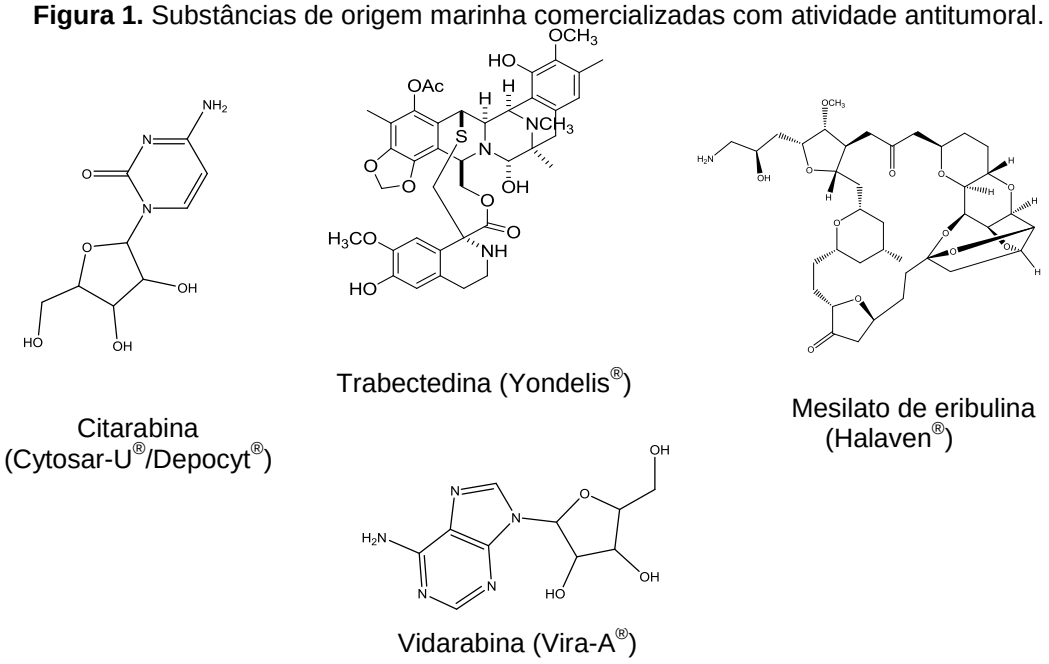
Os oceanos comportam a maior biodiversidade do planeta. O ecossistema que ali existe faz com que os organismos mantenham uma relação de competitividade e, pressionados pelo meio, produzem uma variedade de metabólitos secundários (BERLINCK et al., 2004; GERWICK; FENNER, 2013; PEREIRA; SOARES-GOMES, 2009; SCHUMACHER et al., 2011). Em se tratando do ambiente marinho, na década de 50, foram isoladas as primeiras substâncias de origem marinha, provenientes de esponjas, as quais demonstraram propriedades antivirais e antitumorais que levaram a produção dos fármacos vidarabina (Vira-A®), citarabina (Cytosar-U® e Depocyt®) e mesilato de eribulina (Halaven®) que podem ser vistos na Figura 1 (GERWICK; FENNER, 2013; GERWICK; MOORE, 2012; UZAIR et al., 2012). Dados recentes indicam que mais de 22 mil novas substâncias já foram isoladas, correspondendo a menos de 2% da biodiversidade marinha total (BLUNT et al., 2010; GERWICK; FENNER, 2013; GERWICK; MOORE, 2012).

Além das substâncias citadas anterioremente outras já estão sendo comercializadas, como trabectedina (Yondelis®), um medicamento antitumoral sintetizado por tunicados, cujas estruturas são apresentadas na Figura 1 (BLUNT et al., 2010; DAVID; WOLFENDER; DIAS, 2015; GERWICK; MOORE, 2012; MAYER et al., 2010).

No que diz respeito à microbiota marinha, compostos microbianos marinhos estão sendo recentemente estudados e têm-se observado que moluscos, esponjas e tunicados são fontes ricas de substâncias marinhas, o que não exclui a possibilidade de abrigarem micro-organismos, como bactérias e cianobactérias que podem ser os reais produtores dessas substâncias. O metabolismo destes é considerado uma jóia rara do mundo dos oceanos, sendo responsáveis por 80% do total dos metabólitos submetidos a ensaios clínicos e agentes farmacêuticos aprovados (CHOI; PEREIRA; GERWICK,

2012; GERWICK; FENNER, 2013; GERWICK; MOORE, 2012; MEVERS et al., 2014; MILLER et al., 2014; SCHUMACHER et al., 2011).

Figura 1. Substâncias de origem marinha comercializadas com atividade antitumoral.



De acordo com os estudos realizados nos últimos 30 anos, onde medicamentos antivirais, anticancerígenos, analgésicos e para hiperlipidemia foram aprovados como drogas comerciais, mostra-se interessante a pesquisa de metabólitos secundários utilizando micro-organismos marinhos, inclusive cianobactérias. Com os resultados obtidos ao longo dos anos, mostra-se a importância da busca por novas substâncias com grande potencial farmacológico (GERWICK; MOORE, 2012; UZAIR et al., 2012).

1.1 Cianobactérias

As cianobactérias também conhecidas como cianofíceas ou cianoprocariotas são micro-organismos procariontes, pois não apresentam núcleo e estruturas definidas sendo ainda aeróbios fotossintetizantes, pertencendo à classe das bactérias gram-negativas (MELO; NEVES; BAPTISTA, 2011; PEREIRA; SOARES-GOMES, 2009; SANT'ANNA et al., 2006) As cianobactérias constituem o grupo mais vasto e diversificado dos micro-organismos procarióticos fotossintetizadores, com aproximadamente 2400 espécies, estando presentes no ambiente terrestre há cerca de 3 bilhões de anos (GERWICK; FENNER, 2013). Habitam os mais variados ecossistemas,

como o terrestre, marinho, fluvial, glacial, deserto e águas termais, podendo existir em simbiose com outros organismos, como (MELO; NEVES; BAPTISTA, 2011; SANT'ANNA et al., 2006)

Cianobactérias apresentam algumas vantagens adaptativas a meios inóspitos quando comparadas a outros organismos, como por exemplo, a capacidade de fixar nitrogênio, absorção de luz, tipos de células diferenciadas para reprodução ou descanso e um meio para regular a flutuação (SANT'ANNA et al., 2006).

A maioria dos estudos realizados com cianobactérias teve início no Havaí, Caribe, Madagascar e Papua Nova Guiné, abrindo novas possibilidades para locais ainda inexplorados. A pesquisa de produtos naturais em cianobactérias marinhas possui uma alta taxa de descoberta >95% de novos compostos quando comparado a outros recursos microbianos tradicionais (PEREIRA; SOARES-GOMES, 2009; TAN, 2007).

A maior parte dos metabólitos de cianobactérias são produzidos a partir da via biossintética dos polipeptídeos (ribossomais ou não ribossomais) ou de policetídeos onde atuam policetídeo sintase (PKS) e peptídeo não ribossomal sintetase (NPKS). No que diz respeito ao expressivo potencial farmacológico, esse grupo posssui atividade citotóxica, inibe a atividade de certas enzimas, como proteases, além de possui atividade anticancerígena, antiviral, antimicrobiana, antiinflamatória e antimalárica (GERWICK; FENNER, 2013; NUNNERY; MEVERS; GERWICK, 2010; SINGH et al., 2011)

As florações que ocorrem ao longo da costa são um aumento da densidade de organismos como dinoflagelados, algas e cianobactérias, e que muitas vezes podem modificar a coloração da água, devido à presença de substâncias como clorofila *a*, carotenóides e ficobiliproteínas, de ocorrência nas cianobactérias. Essas florações podem acarretar odor e gosto da água alterados e também produção de toxinas, conhecidas como cianotoxinas, as quais podem aumentar com a presença de nutrientes específicos oriundos do meio ambiente, como a poluição das indústrias, efluentes domésticos e aquecimento global (CARMICHAEL, 1992; SANT'ANNA et al., 2006).

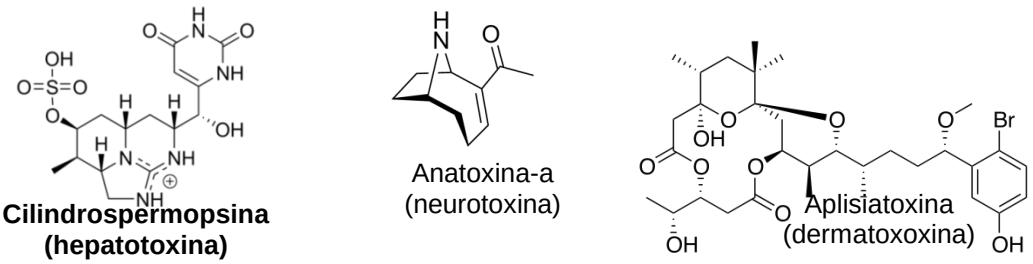
Devido a esse fato, buscam-se novas medidas a fim de evitar danos à saúde pública, como o controle da eutrofização da água, tratamento apropriado

para o consumo humano e informações ao público que utilizam reservatórios de água para atividades recreacionais, ampliando o interesse pelo conhecimento dos metabólitos presentes no meio e que ocasionam esses danos à população (BELLEM; NUNES; MORAIS, 2013; LOZA; PERONA; MATEO, 2013).

As cianotoxinas constituem um grupo bastante diversificado, apresentando assim, diversas propriedades tóxicas. Três classes químicas de metabólitos secundários se destacam na produção de cianotoxinas: peptídeos cíclicos (microcistina e nodularina), alcalóides (anatoxinas, saxitoxinas, cilindrospermopsinas, aplisiatoxinas, lingbiatoxina A) e lipopolissacarídeos (SANT'ANNA et al., 2006; VAN APELDOORN et al., 2007).

Diferentes classes de toxinas já foram identificadas: as hepatotoxinas, como exemplos são destacados a microcistina, nodularina e cilindrospermopsina (Figura 2), produzidas por algumas espécies de *Anabaena, Nodularia, Cylindrospermopsis raciborskii*; as neurotoxinas, que produzem substâncias como, anatoxina-a (*S*) (Figura 2) as saxitoxinas e neo-saxitoxinas e, por fim as citotoxinas, dermatotoxinas, estas produzidas por espécies pertencentes aos gêneros *Lyngbia*, *Oscillatoria* e *Anabaena,* como exemplo a substância aplisiatoxina (Figura 2) (CARMICHAEL, 1992; KAEBERNICK; NEILAN, 2001; SANT'ANNA et al., 2006; ZEGURA; STRASER; FILIPIC, 2011).

Figura 2. Toxinas encontradas em cianobactérias

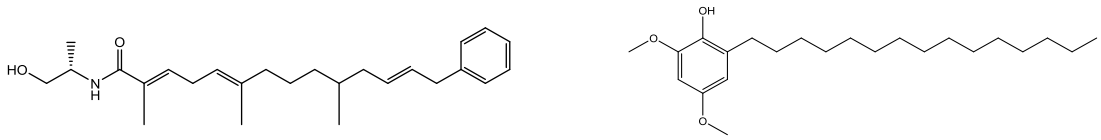


Diversos estudos com cianobactérias marinhas vêm demonstrando além das cianotoxinas, novos metabólitos secundários que podem ser encontrados em diferentes regiões. LEAO et al. (2013) identificaram na espécie *Cyanobium* sp. LEGE 06113 (pertencente à ordem Synechococcales), do litoral de

Portugal, uma substância denominada hierredina B (Figura 3), com atividade antitumoral contra adenocarcinomas de cólon.

Pertencente à ordem Oscillatoriales, o gênero *Moorea*, tem se mostrado bastante promissor na busca por novas substâncias. Dois novos produtos naturais marinhos de cianobactérias foram isolados de uma coleção da espécie *Moorea producens,* oriundas de Porto Rico, e foram denominados de parguerene (Figura 3) e precarriebowmida (MEVERS; BYRUM; GERWICK, 2013). Além destas substâncias outras já foram isoladas de uma espécie do mesmo gênero da anterior, a *Moorea bouillonii,* um depsipeptídeo cíclico citotóxico inédito, denominado de bouillonamida A, além de outras substâncias já isoladas na mesma espécie, a ulongamida A e apratoxina A. A bouillonamida A (Figura 3) foi testada em linhagens de células de neuroblastomas de rato (Neuron 2a), demonstrando moderada atividade citotóxica, enquanto apratoxina A, apresentou atividade significativa, sendo de importância para este tipo de tumor (TAN; OKINO; GERWICK, 2013).

Figura 3. Substâncias isoladas de cianobactérias marinhas das espécies *Moorea producens* (1)*, Cyanobium sp*. (2)



Parguerene
1

Hierredina B
2

Ainda, com relação à ordem Oscillatoriales, outras espécies se mostraram promissoras na produção de novas substâncias, como a espécie *Symploca* sp., coletada em Papua Nova Guiné, levando a descoberta de três novos lipopeptídeos, denominados de tiasamidas C-E, que correspondem a substâncias similares a outras isoladas anteriormente e de espécies semelhantes de cianobactérias filamentosas (MEVERS et al., 2014). Ainda, outros estudos mostraram que o depsipeptídeo cíclico simplostatina 5 é um potente inibidor da atividade proteolítica de elastases; além das carmaficinas A

e B (Figura 4), que apresentaram atividade inibitória de proteassoma peptídico, apresentando citotoxicidade para células cancerígenas de cólon e de pulmão (PEREIRA et al., 2012; SALVADOR et al., 2013).

As carmaficinas foram isoladas no Instituto Scripps de Oceanografia (San Diego - Califórnia, EUA), sob supervisão do Prof. Dr. William H. Gerwick. A partir desta oportunidade, foram isolados metabólitos secundários de diferentes espécies de cianobactérias marinhas, dentre estas algumas por meio de técnicas de eliciação química, os quais culminaram na publicação de um artigo na ChemBioChem (PEREIRA et al., 2012) e duas patentes: "Compositions and methods for inhibiting proteases", Instituição de registro:WIPO - World Intellectual Property Organization e "Methods of promoting neuron growth". A continuidade deste trabalho realizado em colaboração entre os laboratórios de nosso grupo e do Prof. Gerwick, levou a publicação do artigo no *Journal of Natural Products* (YANG et al., 2013), envolvendo carmaficinas, o qual foi classificado no site da revista como um dos vinte artigos mais visualizados em menos de um ano.

Além das substâncias supracitadas, uma estrutura foi isolada de uma espécie de cianobactéria marinha *Rivularia sp.* (pertencente à ordem Nostocales), denominada de viequeamida A (Figura 4), a qual demonstrou atividade citotóxica na linhagem celular cancerígena H460 de pulmão humano (BOUDREAU et al., 2012; MILLER et al., 2014; PEREIRA et al., 2012; SALVADOR et al., 2013).

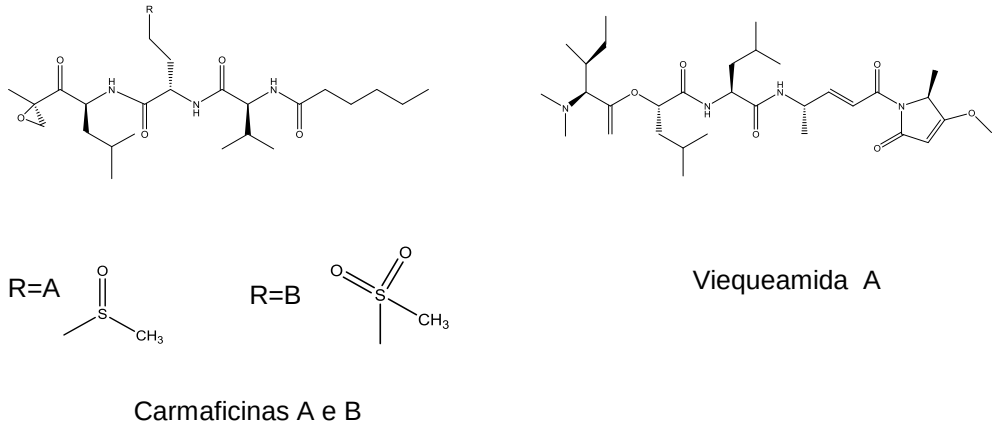


Figura 4. Substâncias isoladas de cianobactérias marinhas com potencial anticancerígeno

A produção de metabólitos secundários estruturalmente variados e pertencentes a gêneros diferentes, aliada aos processos de adaptação das cianobactérias, contribuem para a exploração sustentável desta diversidade de organismos, facilitada muitas vezes pela vantagem em relação ao seu cultivo, o qual é econômico e requer apenas alguns nutrientes inorgânicos (LININGTON et al., 2009; NUNNERY; MEVERS; GERWICK, 2010).

1.2 Micro-organismos endofíticos

O termo endofítico foi adotado inicialmente por De Bary, em meados do século XIX, fazendo alusão a qualquer micro-organismo que habitasse tecidos saudáveis de plantas (NISA et al., 2015). Considera-se como endófito o micro-organismo que passa ao menos parte de seu ciclo de vida dentro de tecidos saudáveis de uma planta ou organismo autotrófico, numa relação que pode variar de fitopatogênese latente a simbiose mutualística (STROBEL et al., 2004).

A relação micro-organismo endófito-hospedeiro pode resultar em benefícios a ambos, fornecendo resistência às adversidades do meio, com produção de metabólitos bioativos pelo endófito, permitindo maior crescimento do hospedeiro e competitividade na natureza (FLOREZ et al., 2015; NISA et al., 2015). Em contrapartida, o endófito tem como benefício os nutrientes fornecidos pelo hospedeiro, proteção e menos competição com a microbiota externa ao hospedeiro facilitando seu desenvolvimento (FLOREZ et al., 2015).

Estudos mostram que metabólitos secundários bioativos isolados de fungos algícolas incluem compostos com atividade antifúngica, antioxidante, antiparasitária e antitumoral (KRALJ et al., 2006; ZHANG; LI; WANG, 2007), resultante de sua grande capacidade metabólica, com diversificada classe de substâncias, como terpenóides, alcaloides, flavonoides, fenilpropanóides, glicosídeos, entre outros (BLUNT et al., 2015). Dessa forma, esses micro-organismos marinhos demonstram capacidade biossintética promissora quanto à produção de metabólitos biologicamente funcionais (BERLINCK et al., 2004; PENESYAN; KJELLEBERG; EGAN, 2010).

1.3 Co-cultivo entre cianobactéria e fungo

Cianobactérias e fungos podem viver em sistema de simbiose na natureza em associações mutualísticas chamadas liquens. Neste sistema eles desenvolvem mecanismos de sobrevivência, os quais podem não ser vistos individualmente. A produção de metabólitos secundários permite a sobrevivência em ambientes extremos, podendo aumentar a proteção contra os raios UV e a produção de substâncias antibacterianas. Além disso, foi também evidenciada uma alta atividade citostática, sugerindo um potencial anticâncer, além de relatos da produção de toxinas encontradas em liquens, reforçando o fato de que há interação ecológica entre as espécies (PAPAZI et al., 2015; SANTOS; REIS, 2014; SCHERLACH; GRAUPNER; HERTWECK, 2013; WREDE et al., 2014).

Atualmente buscam-se novas fontes de biocombustíveis naturais para dessa forma diminuir a poluição do meio ambiente, onde muitas espécies de cianobactérias já são comercializadas com esta finalidade (WREDE et al., 2014). Por este motivo, co-culturas de cianobactérias e fungos vêm sendo testadas com o intuito de aumentar a produção de polissacarídeos, visto como um processo tecnológico inovador para fins industriais e para fins medicinais com a obtenção de substâncias com potencial atividade biológica (ANGELIS et al., 2012; SANTOS; REIS, 2014; WREDE et al., 2014). Em outro estudo foi observado o aumento da produção de hidrogênio e consequentemente também de energia, o que reforça essa importância biotecnológica (PAPAZI et al., 2015).

Esta forma de co-cultura se torna mais fácil devido à alta eficiência de crescimento dos micro-organismos e de forma econômica sem adição de componentes químicos. A interação de cianobactérias e fungos pode ser evidenciada em alguns estudos onde foi notada a produção de novos polissacarídeos a partir da interação de ambos, com predominância na produção de metabólitos pelos fungos (ANGELIS et al., 2012; WREDE et al., 2014).

Um estudo promissor relatou que o fungo *Trichoderma citrinoviride*, isolado de floração de cianobactéria *Microcystis* em deterioração foi cultivado em laboratório em co-cultura com a espécie de cianobactéria *Microcystis*

aeruginosa. O fungo foi capaz de inibir o crescimento da mesma, bem como da produção de microcistinas, que são substâncias potencialmente tóxicas quando ocorrem as florações. Este dado é muito interessante para controle de florações e degradação de toxinas, sendo uma possível alternativa a ser testada, já que relatados de fungos como algicidas ainda é bastante inexplorado (MOHAMED; HASHEM; ALAMRI, 2014).

Sendo assim, de acordo com os interessantes relatos descritos, propusemos neste projeto realizar uma co-cultura entre a cianobactéria *Cyanobium* sp. CENA139 e uma cepa de fungo pertencente à família Xylariaceae, com a finalidade de observar a interação ecológica e química entre esses dois micro-organismos, a fim de verificar se houve produção de novos metabólitos secundários, que não seriam produzidos na ausência de estímulos.

Objetivos

– II –

OBJETIVOS

Este projeto tem, por objetivo geral, a investigação química em busca de metabólitos secundários biologicamente ativos em uma linhagem de cianobactéria proveniente de mangue, e de um micro-organismo endofítico T68 (Xylariaceae).

2.1 Objetivos Específicos

- Cultivo da cianobactéria *Cyanobium* sp. CENA139 e do fungo endofítico T68 (Xylariaceae) isolado da alga marinha *Bostrychia tenella;*

- Realizar o co-cultivo da cianobactéria CENA139 e do fungo endofítico T68, avaliando possível eliciação biológica;

- Triagem química (CCDC, CLAE, CL-EM e RMN de ^{1}H) de extratos e frações obtidos de culturas isoladas e da co-cultura;

- Triagem biológica dos extratos e/ou frações através do ensaio de citotoxicidade MTT e atividades antimicrobianas *in vitro*;

- Promover fracionamentos cromatográficos dos extratos e frações obtidas visando ao isolamento e elucidação estrutural de metabólitos secundários.

Material e Métodos

– III –

MATERIAL E MÉTODOS

3.1Material e equipamentos utilizados

Solventes

- Solventes para extração, fracionamento e isolamento: solventes orgânicos grau técnico (purificados por destilação fracionada) e de grau analítico;
- Solventes deuterados: metanol-D4 (D 99,8%) e óxido de deutério 99,9%, ambos sem TMS, da marca Sigma-Aldrich®.
- Solventes grau cromatográfico: Metanol e Acetonitrila da marca Merck® e J. T. Baker®.

Meios de cultivo

- Meio SWBG-11 (Sea water BG-11) (Tabela 1):

Tabela 1- Componentes do meio SWBG-11.

Componentes	Solução Estoque (g/L)	Usar por litro de meio	Concentração Final no meio (g/L)
1.NaCl	-	-	12,5
2.$MgCl_2.6H_2O$	-	-	1,0
3 KCl	-	-	0,25
4.$NaNO_3$	150	10 ml	1,5
5.K_2HPO_4	40	1 ml	0,04
6.$MgSO_4.7H_2O$	75	1 ml	0,075
7.$CaCl_2.2H_2O$	36	1 ml	0,036
8.Ácido Cítrico	6	1 ml	0,006
9.Citrato de Amônio Férrico	6	1 ml	0,006
10.Na_2EDTA	1	1 ml	0,001
11.Micronutrientes*	-	1 ml	-
12.Carbonato de sódio	20	1 ml	0,02

Tabela 1 (continuação)- Componentes do meio SWBG-11

***Solução de Micronutrientes**

H_3BO_3	2,86	g/L
$MnCl_2.4H_2O$	1,81	g/L
$ZnSO_4.7H_2O$	0,222	g/L
$Na_2Mo_4.2H_2O$	0,39	g/L
$CuSO_4.5H_2O$	0,079	g/L
$Co(NO_3)_2.6H_2O$	0,049	g/L

- Meio PDB (Potato Dextrose Borth): (Infusão de batata (200,0 g/L), dextrose (20,0 g/L) – Acumedia®, água do mar natural;
- Meio Arroz: 90g de arroz parboilizado esterilizado em autoclave (120 °C, 40 minutos).

Cromatografia em camada delgada

- Placas cromatográficas comparativas (CCDC) de alumínio impregnadas com sílica gel F (254 nm), com 0,25 mm de espessura da marca Fluka Analytical®;
- Reveladores: solução comercial de iodo-cloro-platinado da marca Sigma-Aldrich®, solução de anisaldeído, iodo ressublimado e luz UV.

Cromatografia líquida a vácuo

- Coluna cromatográfica de vidro com placa sinterizada;
- Sílica gel-60 (40-70 mesh);
- Kitassato de 1000 mL;
- Bomba de vácuo, modelo TE-058, marca Tecnal®

Equipamentos

- Centrífuga da marca Hitashi® modelo CR22GII;
- Fluxo laminar esterilizado – Pachane;

- Autoclave vertical - PHOENIX;
- Evaporador rotativo da marca Buchi®, modelo R-210;
- Cromatógrafo da marca Shimadzu®, modelo SCL-10AVP, com detector de arranjo de diodos UV-Vis DAD Shimadzu, modelo SDP-M10AVP, bombas LC-6AD e sistema de integração computadorizado com *software* CLASS-VP, coluna C-18 Supelco (5 µm, 4,4 mm x 25 cm), purificador Millipore Sist-Direct-Q5, filtro 0,22 µm (Laboratório de Química Orgânica – NPPNS do Departamento de Física e Química da FCFRP-USP);
- Espectrômetro de massas acoplado a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-EM/EM) Íon-Trap BRUKER-daltonics, com equipamentos Shimadzu®, como bombas, modelo LC-20AD, amostrador SIL-20AHT, detector de arranjo de diodos DAD, modelo SPM-20A, comunicador CBM-20ª e forno CTO-20A (Laboratório de Química Orgânica – NPPNS do Departamento de Física e Química da FCFRP-USP, Prof. De. Norberto Peporine Lopes)
- Espectrômetro de massas da marca Bruker, modelo microTOF II com fonte de ionização em elétron-spray (ESI), com analisador do tipo tempo de vôo (TOF), Calibrante: NaTFA (Laboratório de Química Orgânica – NPPNS do Departamento de Física e Química da FCFRP-USP, Prof. De. Norberto Peporine Lopes);
- Cromatógrafo a gás, Shimadzu, modelo QP 2010, em um sistema operado com detector de massas com impacto eletrônico (70 eV), e injeção Split (250 °C) (Laboratório de Química Orgânica – NPPNS do Departamento de Física e Química da FCFRP-USP, Prof. De. Norberto Peporine Lopes);
- Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear, equipamento de RMN da marca Bruker, modelo DRX 500 (500 MHz), Departamento de Química-FFCLRP-USP.

3.2 Coleta, isolamento e identificação taxonômica das linhagens de cianobactérias

3.2.1 Coleta

Amostras provenientes de manguezal, coletadas da Ilha do Cardoso (25°05´02´´S/47°57´42´´W), do Estado de São Paulo (SILVA et al., 2014), pertencentes ao Laboratório de Ecologia Molecular de Cianobactérias sob a responsabilidade da Profa. Dra. Marli F. Fiore (Centro de Energia Nuclear na Agricultura, CENA/USP) foram acondicionadas em caixas térmicas e transportadas ao Laboratório de Química Orgânica do Ambiente Marinho-NPPNS (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, FCFRP/USP).

A linhagem de cianobactéria selecionada neste projeto foi a *Cyanobium* sp. CENA 139, da ordem Synechococcales, coletada na, cultivada em meio SWBG-11.

3.2.2 Isolamento e identificação taxonômica

As cianobactérias estão sendo mantidas em água do mar artificial esterilizada (meio SWBG-11), à temperatura de 25 ± 1° C, sob iluminação fluorescente (40 µmol photon·m^{-2}·s^{-1}) a 24 ± 1º C, em ciclos de claro e escuro (16h/8h), a composição do meio está na tabela 1:

Foi acrescentado ao meio 100 µL de vitamina B para 1 L de meio SWBG-11 e também foram feitos brancos do meio como controle.

Os meios foram esterilizados em autoclave. Para o isolamento das linhagens foram realizadas repicagens e estriamentos sucessivos até o estabelecimento da condição monoespecífica das culturas de cianobactérias (MAUMUS et al., 2011) a qual foi verificada por meio de microscópio óptico ao longo de todo o procedimento. Os cultivos foram realizados em placas de Petri (15x90 cm de diâmetro) contendo meio sólido específico para crescimento de cianobactérias (SWBG-11), mantidas em câmara de crescimento com temperatura de 25 ± 1° C, sob iluminação fluorescente. Este procedimento foi realizado no Laboratório de Ecologia Molecular de Cianobactérias (CENA/USP)

e as culturas estão sendo mantidas no Laboratório de Química Orgânica do Ambiente Marinho (FCFRP/USP).

A identificação taxonômica das linhagens de cianobactérias foi realizada de acordo com o sistema polifásico de classificação mais atual, com a colaboração do grupo de pesquisa da Dra. Marli de Fátima Fiore (CENA/USP) (SILVA et al., 2014), com o auxílio do Dr. Marcelo Gomes Marçal Vieira Vaz, que nos forneceu as linhagens devidamente identificadas.

As linhagens de cianobactérias isoladas estão sendo cultivadas no Laboratório de Química Orgânica do Ambiente Marinho. Para a produção de biomassa, foram utilizados frascos do tipo Erlenmeyer de 250 mL, 500 mL, 1 L, 2 L, 3 L e 4 L, as repicagens foram feitas em fluxo laminar, após 6 meses de crescimento foram extraídas e em seguida foi feita a avaliação do perfil químico das mesmas.

3.3 Obtenção da cultura do fungo Xylariaceae T68

A linhagem do fungo endofítico T68 foi isolada da alga marinha *Bostrychia tenella* (J.V. Lamouroux) J. Agardh em trabalhos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa (DE FELICIO et al., 2010), e está sendo mantido no Laboratório de Química Orgânica do Ambiente Marinho (NPPNS) - FCFRP-USP, junto com a coleção de linhagens de fungos endofíticos. Esta linhagem encontra-se preservada de dois modos: em água, segundo (CASTELANI, 1963) e em óleo mineral, segundo ARAUJO et al. (2002). Para reativação da linhagem microbiana, as amostras preservadas em óleo mineral foram transferidas para placa de Petri com meio sólido PDA. As placas foram mantidas a 25°C, acompanhando até o crescimento do micro-organismo por toda a placa de Petri. Após esse período, foram transferidos 10 plugs de cada linhagem para três frascos tipo Erlenmeyer com os meios de cultura. Todos estes procedimentos envolvendo a manipulação do micro-organismo foram realizados em capela de fluxo laminar e com material esterilizado, e os meios de cultura foram preparados com água do mar.

3.4 Co-cultura de cianobactéria *Cyanobium* sp. CENA139 e fungo T68

A co-cultura foi realizada em dois meios diferentes com estes dois micro-organismos, para avaliar como cada um interferiria no ambiente do outro.

Em meio SWBG-11, onde são cultivadas as cianobactérias, foi utilizada a espécie *Cyanobium* sp. CENA139. Foi feito um cultivo com três frascos do tipo Erlenmeyer de 500 mL contendo apenas cianobactéria, três contendo apenas o fungo e outros três contendo a co-cultura, e somente no terceiro dia foi acrescentado a este meio o fungo T68.

O meio utilizado para o cultivo do fungo T68 foi o Arroz e, no terceiro dia de cultivo, foi acrescentado a este meio 50 mL do meio da espécie *Cyanobium* sp. CENA139. Foi feito um cultivo com três frascos do tipo Erlenmeyer de 500 mL contendo apenas cianobactéria, três contendo apenas o fungo e três contendo a co-cultura, e somente no terceiro dia foi acrescentado a este meio a espécie *Cyanobium* sp. CENA139. Juntamente com este experimento foram preparados frascos do tipo Erlenmeyer com os controles.

3.5 Extração, fracionamento e triagem química preliminar dos metabólitos

3.5.1 Extração e triagem química preliminar

As culturas foram avaliadas no período de vinte e oito dias. Para a obtenção dos extratos em meio SWBG-11, as amostras foram centrifugadas e depois extraídas com diclorometano:metanol (2:1) 3 vezes sob agitação e 5 min em sonicação. A seguir, as amostras foram concentradas em rotaevaporador à temperatura de 35º C.

A extração orgânica para a obtenção dos extratos do meio Arroz foi realizada adicionando 200 mL da mistura de diclorometano:metanol (2:1) a cada frasco tipo Erlenmeyer, em maceração por 24 h. Em seguida, os micélios foram extraídos em funil de Büchner, repetindo o procedimento de extração com os mesmos solventes mais duas vezes. Os extratos foram concentrados à pressão reduzida com temperatura máxima do banho de 40º C. As massas obtidas dos extratos estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2- Rendimento dos extratos brutos obtidos de cultura isolada e cultura mista das espécies *Cyanobium* sp. CENA139 e T68 em meio SWBG-11 e Arroz

Meio SWBG-11	SWBG-11	Arroz
Cyanobium sp.CENA 139	33,85 mg	2.473,16 mg
Fungo T68	39,34 mg	3.280,73 mg
Cyanobium sp. CENA139+ Fungo T68	42,71 mg	3.139,85 mg

Os extratos brutos obtidos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência, equipada com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) em fase reversa. Foi utilizada coluna analítica C-18 Supelco (5 µm, 4,4 mm x 25 cm), monitoramento na região do ultravioleta na faixa de 190 - 400 nm, com Fase móvel: acetonitrila (ACN) e água (H_2O) com gradiente exploratório: 0-40 min (5% ACN e 95% H_2O); 40-50 min (100% de ACN); 50-55 min (5% ACN e 95% H_2O). O fluxo utilizado foi de 1 mL/min com volume de injeção de 20 µL, com amostras preparadas na concentração de 1 mg/mL. Também foram realizadas CCDs e reveladas com Anisaldeído, iodo-cloro-platinado e Dragendorff.

3.5.2 Fracionamento, isolamento e identificação de metabólitos

Os extratos brutos foram fracionados por cromatografia líquida em coluna clássica. O gradiente de solventes foi feito com polaridade crescente (n-Hexano, acetato de etila e metanol) (Figuras 5 e 6):

- 100% n-Hexano;
- 80% n-Hexano / 20% AcOEt;
- 70% n-Hexano/30% AcOEt;
- 60% n-Hexano/40% AcOEt;
- 40% n-Hexano /60% AcOEt;
- 20% n-Hexano /80% AcOEt;
- 100% AcOEt;
- 75% AcOEt /25% MeOH;
- 100% MeOH.

Figura 5: Fluxograma de fracionamento e purificação dos extratos e frações do micro-organismo T68.

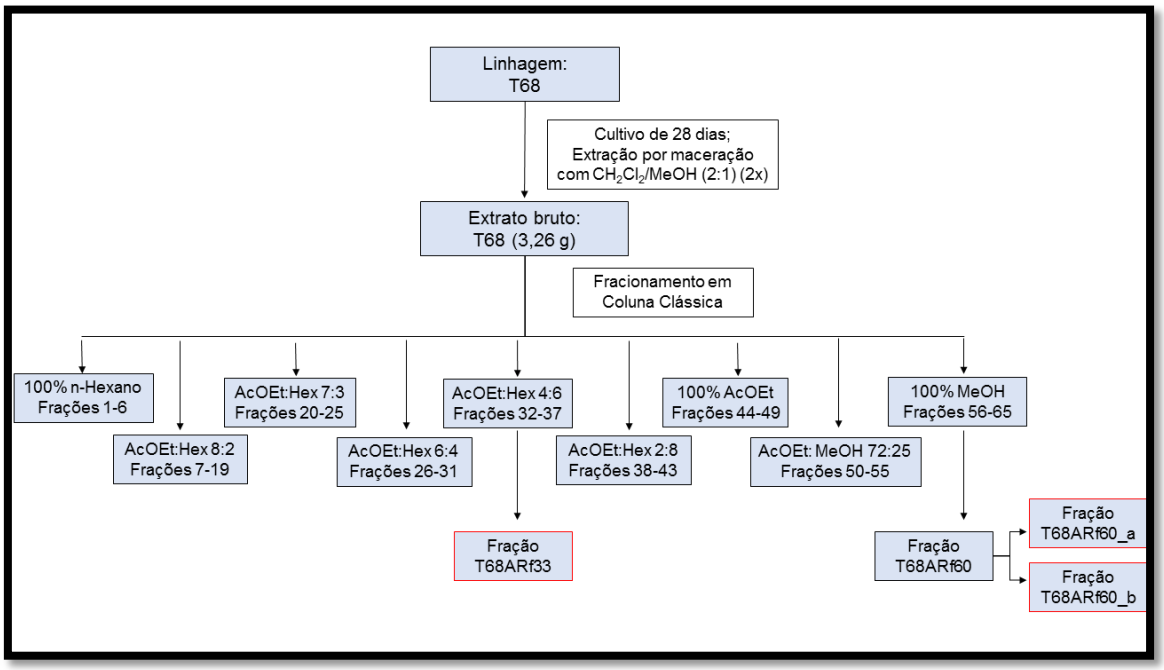
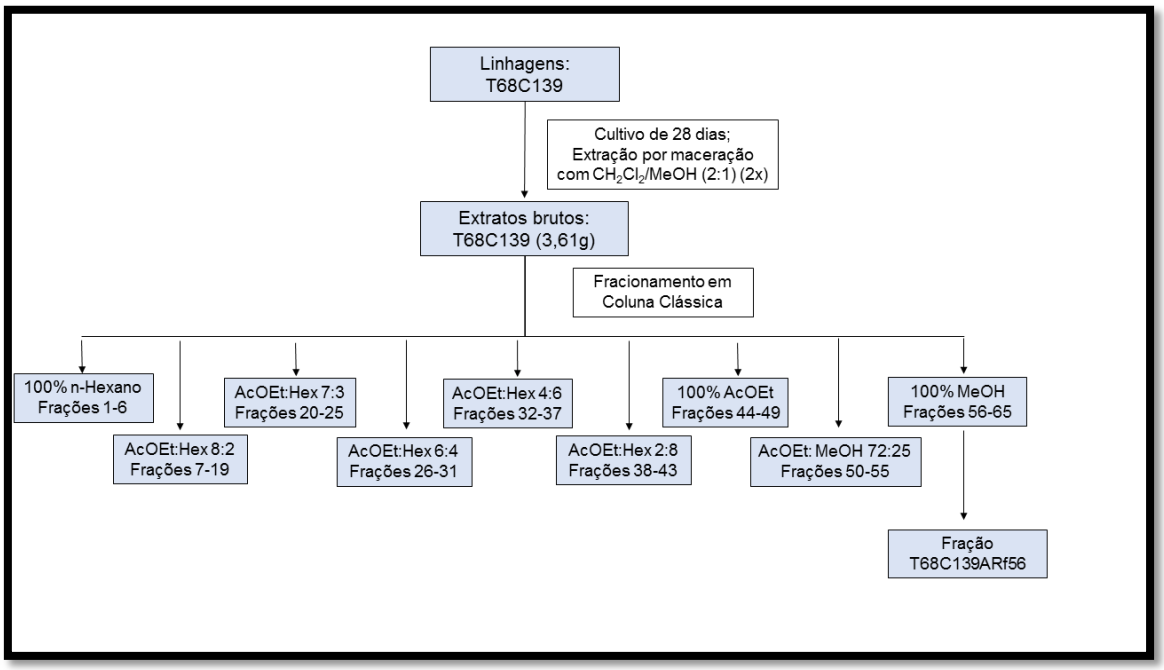


Figura 6: Fluxograma de fracionamento e purificação dos extratos e frações da co-cultura T68C139.



Após análise das frações via cromatografia em camada delgada (CCDC), as frações mais promissoras foram analisadas por CLAE-DAD nas mesmas condições exploratórias dos extratos brutos (item 3.5.1).

As análises das frações por CLAE-DAD em fase reversa foram alteradas e adequadas de acordo com a necessidade de melhorar a resolução dos picos cromatográficos. As frações com melhores resoluções foram submetidas a CLAE-DAD semi-preparativa.

3.5.2.1 Isolamento e identificação estrutural da fração T68ARf33

Para a análise da fração T68ARf33, foram realizadas cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), utilizando o revelador físico UV ƛ = 254 nm e os reveladores químicos anisaldeído, iodocloro platinado e iodo ressublimado.

Foi realizada uma injeção da amostra T68ARf33 em CLAE-DAD com coluna Supelco (LC-18 6 x 250 mm; 25 cm), modo analítico. Fase móvel: H_2O e ACN. Gradiente: 0-5 min (2% de ACN), 5-40 min (2 a 100% de ACN). Fluxo: 1 mL/min.

Em seguida a amostra T68ARf33 foi submetida a análises espectroscópicas por RMN ^{1}H e ^{13}C uni e bidimensionais; e espectrométricas por espectrometria de massas em alta resolução por ionização em *electrospray* (EM-IES-AR) modos positivo e negativo, bem como cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas CG-EM.

3.5.2.2 Isolamento e identificação estrutural da fração T68ARf60

Foi realizada uma injeção da amostra T68ARf60 em CLAE-DAD com coluna Supelco (LC-18 6 x 250 mm; 25 cm), modo analítico. Fase móvel: H_2O e ACN. Gradiente: 0-60 min (5 a 60% de ACN), 60-90 min (60 a 100% de ACN). Fluxo: 1 mL/min. Em seguida, foi realizada uma separação em escala semi-preparativa em coluna Phenomenex (LC-18 1,5 x 250 mm; 25 cm), utilizando as mesmas condições de fase móvel e gradiente da injeção analítica, porém com fluxo de 4 mL/min, resultando em 8 picos, de modo que os picos coletados em 55-57 (T68ARf60_a) e 67-70 (T68ARf60_b) minutos apresentaram maior massa e foram submetidos a análises espectroscópicas por RMN ^{1}H e ^{13}C uni

e bidimensionais; e espectrométricas por espectrometria de massas em alta resolução por ionização em *electrospray* (EM-IES-AR) modos positivo e negativo.

3.5.2.3 Isolamento e identificação estrutural da fração T68C139ARf56

Foi realizada uma injeção da amostra T68C139ARf56 em CLAE-DAD com coluna Supelco (LC-18 6 x 250 mm; 25 cm), modo analítico. Fase móvel: H_2O e ACN. Gradiente: 0-60 min (5 a 60% de ACN), 60-90 min (60 a 100% de ACN). Fluxo: 1 mL/min. Em seguida, foi realizada uma separação em escala semi-preparativa em coluna Phenomenex (LC-18 1,5 x 250 mm; 25 cm), utilizando as mesmas condições de fase móvel e gradiente da injeção analítica, porém com fluxo de 4 mL/min, coletando o pico em 78 minutos sendo submetido a análises espectroscópicas por RMN ^{1}H e ^{13}C uni e bidimensionais; e espectrométricas por espectrometria de massas em alta resolução por ionização em *electrospray* (EM-IES-AR) modos positivo e negativo

3.5.3 Análises em CG-EM

As frações n-hexânicas do extrato bruto em meio arroz T68 e a substância isolada T68ARf33 a partir da cromatografia em coluna clássica foram analisadas em cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas e os valores para as substâncias identificadas na análise foram iguais ou superiores a 90% de similaridade com o banco de dados do próprio equipamento.

3.6 Avaliação das atividades biológicas dos extratos e frações

3.6.1 Avaliação da atividade antibacteriana

Os experimentos de atividade antibacteriana foram realizados no Departamento de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, no laboratório de Farmacognosia, sob supervisão da Profa. Dra. Niege A.J.C. Furtado.

As seguintes bactérias provenientes da American Type Culture Collection foram utilizadas neste estudo: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis* ATCC 29906 e *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* ATCC 13883.

Determinação da concentração inibitória mínima (MIC). Foi utilizado o método de microdiluição em microplaca segundo a metodologia preconizada pelo "National Committee for Clinical Laboratory Standards" (NCCLS, 2003), atualmente denominado Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), com adaptações. Foram utilizadas para a preparação dos inóculos e posterior realização dos ensaios, bactérias de crescimento de 24h nos meios de cultura apropriados. Os inóculos foram padronizados em espectrofotômetro por comparação com o tubo 0,5 da escala de McFarland. Em microplacas foram depositados o caldo Mueller Hinton com os extratos ou substâncias e testadas nas concentrações de 50 a 400µg/mL e os inóculos tendo um volume final em todos os poços de 100µL. Penicilina e estreptomicina foram utilizadas como controles positivos. Foram realizados os controles de esterilidade do caldo, extratos, substâncias testadas e padrões, bem como os controles de crescimento das culturas. As placas foram incubadas a 37° C em estufa bacteriológica por 24 h. Após o tempo de incubação foi adicionado em cada poço 30µL de sal de tetrazólio na concentração de 0,02% preparado em solução aquosa. Para a realização da leitura foi observada a mudança de coloração da mesma através de uma reação de oxi-redução.

3.6.2 Fototoxicidade por captação de vermelho neutro

O extrato bruto T68 e o composto isolado T68ARf33 foram selecionados para o teste de fototoxicidade por captação do vermelho neutro em fibroblastos murinos 3T3, em duplicata. O teste foi realizado pela doutoranda Renata Spagolla, em colaboração ao Laboratório de Tecnologia de Cosméticos, coordenado pela Profa. Dra. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro. Nesse teste, células 3T3 de Balb/c cultivadas em duas microplacas de 96 poços, foram pré-incubadas com oito concentrações diferentes da substância química a ser analisada. Uma placa foi então exposta à radiação UVA e a outra mantida ao

abrigo da luz, para a determinação da viabilidade celular na presença e ausência de radiação para a posterior determinação da cito e fototoxicidade da substância, segundo o modelo de predição do teste que é baseado no MPE (foto efeito médio), em que uma substância de ensaio com valores abaixo de 0,1 prediz não fototóxico, valores entre 0,1 e 0,15 é previsto como "provavelmente fototóxico" e valores superiores a 0,15 prediz “fototóxico” (LIEBSCH et al., 2005).

3.6.3 Cultura celular da linhagem tumoral HepG2 e Ensaio de citotoxicidade MTT

A linhagem celular HepG2 (HB-8065, carcinoma hepatocelular) foi obtida da American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). As células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10 % de soro bovino fetal e um mix de antibióticos penicilina (100 U mL^{-1}) e estreptomicina (100 µg mL^{-1}). As células foram ressuspendidas a concentração de 2×10^5 células mL^{-1}. Aplicou-se 200 µL da suspensão por poço da placa de 96 poços, contendo assim, em cada poço, 4×10^5 linfócitos. Após 24 horas de incubação nas mesmas condições que a cultura, foram realizados os experimentos de citotoxicidade MTT.

O ensaio do MTT foi realizado em colaboração com o Laboratório de Nutrigenômica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRPUSP) sob supervisão da Profa. Dra. Lusânia Maria Greggi Antunes. Originalmente descrito por MOSMANN (1983) e realizado com pequenas modificações, o método utilizou-se do reativo 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo (comumente referido como reativo MTT). Para o tratamento das culturas celulares, foram preparadas soluções-mãe das amostras dos extratos e frações, solubilizados em DMSO em concentração de 10 mg/mL e diluídas nas concentrações finais de 25, 50, 75 e 100 µg/mL. Foram preparados um controle positivo (MMS a 200 µM de concentração final), um controle do solvente (solução de DMSO a 1% concentração final) e o controle negativo do experimento (solução de tampão fosfato - PBS). Para cada amostra teste ou controle, foram tratados 3 poços da placa por

experimento. Todas as soluções foram preparadas utilizando-se a solução de tampão fosfato.

As células tratadas foram incubadas por mais 24 horas a 37 ºC e 5% de CO_2 em estufa de atmosfera úmida e após esse período foi preparado o reativo de MTT (concentração de 5 mg/mL), expondo as células a 20 µL de solução por poço, por um período de 3 horas (CAVALCANTI et al., 2008). Após esse período de incubação, a placa foi centrifugada e o sobrenadante descartado, realizando-se uma ressuspensão dos cristais de formazan em 100 µL de DMSO, sob agitação leve, e realizando a leitura da absorbância dos poços em um leitor de placas, em comprimento de ondas de 570 nm. Os experimentos de citotoxicidade foram realizados em triplicata. Os dados foram analisados utilizando-se ANOVA-Dunnet através do software GraphPad Prism 5.

Resultados

– IV –

RESULTADOS e DISCUSSÃO

4.1 Triagem química preliminar

Os extratos brutos e frações das culturas isoladas da linhagem *Cyanobium* sp. CENA139, do fungo T68 e da cultura mista em meio arroz dos micro-organismos foram submetidas a análises via CCD. Estes mesmos extratos também tiveram seu perfil químico avaliado por meio de CLAE-DAD (figuras 7 a 11).

Através da análise comparativa dos cromatogramas dos extratos brutos obtidos com o cromatograma do extrato obtido a partir de meio de cultura sem inóculo (branco, figura 10), foi possível verificar que a cultura da cianobactéria CENA139 (figura 8) não se desenvolveu em meio arroz. Com relação ao cromatograma da cultura mista T68CENA139 (figura 9), nota-se grande semelhança com o cromatograma da cultura isolada do fungo T68, com aumento na produção metabólica, de acordo com o aumento no número de picos no cromatograma, indicando que durante o período de cultura, a presença da cianobactéria CENA139 promoveu a eliciação do fungo T68, com ativação na produção metabólica.

A eliciação do micro-organismo deu-se devido ao fato de que em meio arroz, por se tratar de um meio opaco, sem passagem de luz, a cianobactéria não foi capaz de realizar fotossíntese, sendo um meio mais propício para o desenvolvimento do fungo T68 do que para a cianobactéria CENA139.

Figura 7: Cromatograma obtido via análise em CLAE-DAD. Extrato bruto em meio arroz do fungo T68, λ = 254 nm

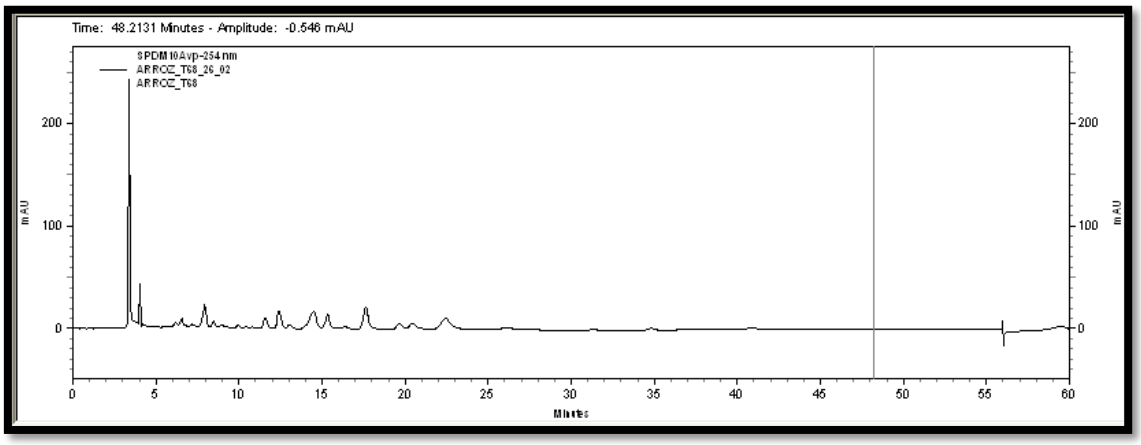


Figura 8: Cromatograma obtido via análise em CLAE-DAD. Extrato bruto em meio arroz de *Cyanobium* sp. CENA139, λ = 254 nm.

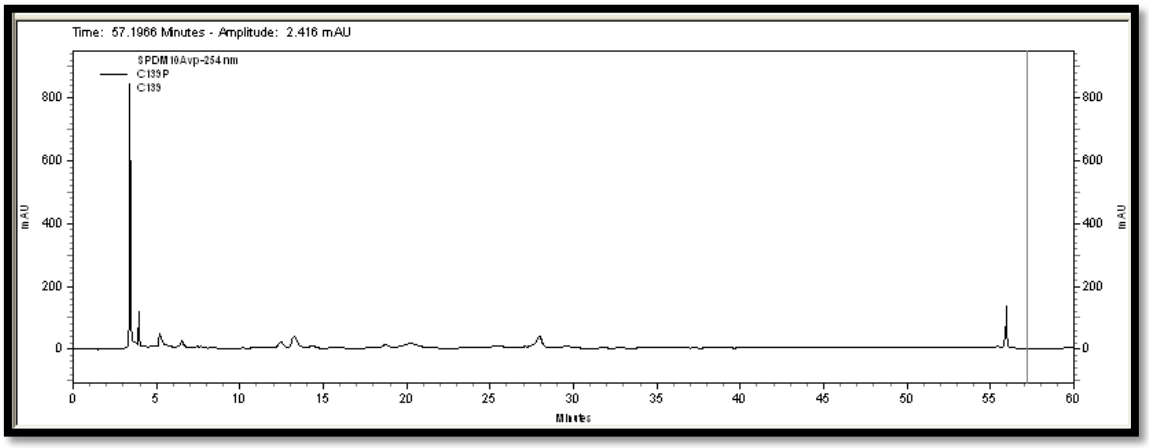


Figura 9: Cromatograma obtido via análise em CLAE-DAD. Cultura mista em meio arroz do fungo T68 com *Cyanobium* sp. CENA139, λ = 254 nm.

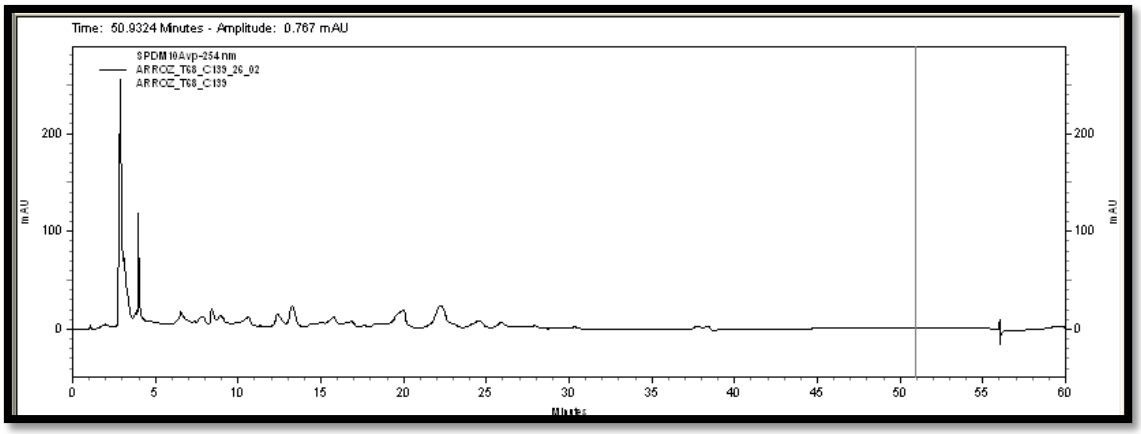


Figura 10: Cromatograma obtido via análise em CLAE-DAD. Meio de cultura arroz, λ = 254 nm.

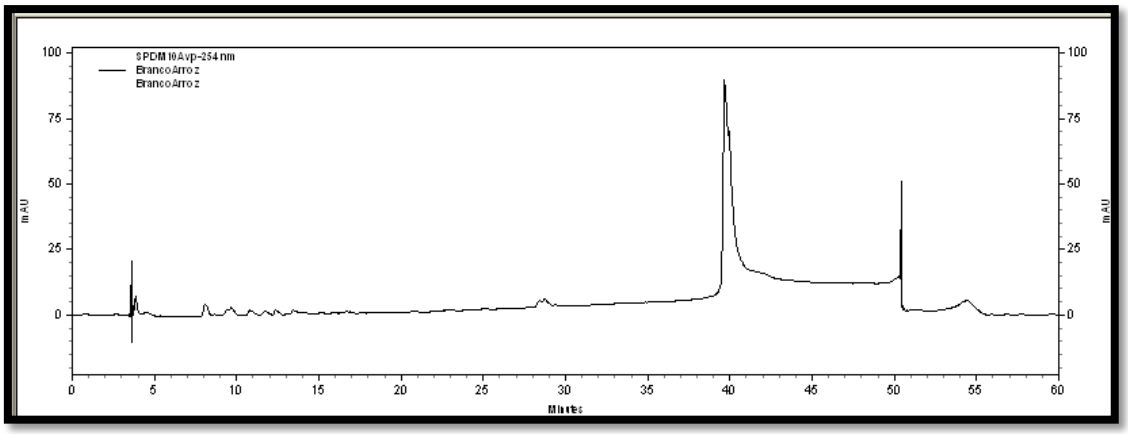
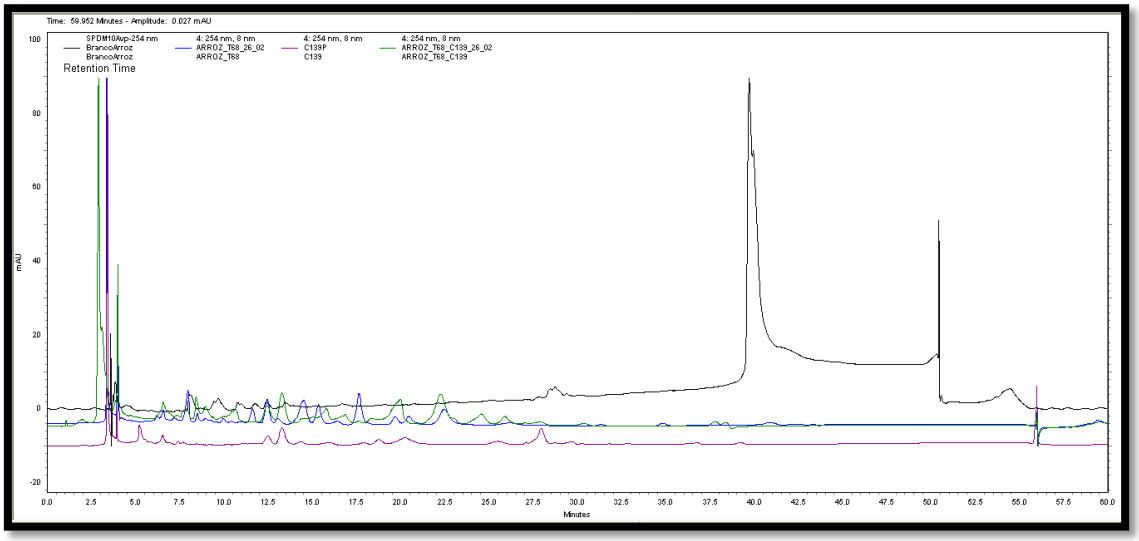


Figura 11: Sobreposição dos cromatograma obtidos via análise em CLAE-DAD. Em azul, extrato bruto em meio arroz do fungo T68; em roxo, extrato bruto em meio arroz de *Cyanobium* sp. CENA139; em verde, cultura mista em meio arroz do fungo T68 com *Cyanobium* sp. CENA139; em preto, meio de cultura arroz. λ = 254 nm.



As CCDs demonstraram a presença de compostos nitrogenados para os extratos brutos em meio arroz do fungo T68 e da cultura mista entre T68 e *Cyanobium* sp. CENA139. As placas foram reveladas com iodo-cloroplatinado, comparando com padrões de aminoácidos arginina (aminoácido alifático) e guanina (aminoácido cíclico), formando manchas brancas como resultado positivo. As frações isoladas, entretanto, não apontaram para presença de nitrogênio, nas análises via CCD. As amostras apresentaram absorção no UV

abaixo de 350 nm, e como amostras muito polares apresentam uma complexidade maior para serem trabalhadas, diferentes técnicas de purificação e isolamento foram utilizadas.

4.2 Análises em CG-EM

As frações de menor polaridade foram avaliadas por CG-EM, considerando-se apenas os picos com porcentagem de área ≥ 2% que apresentaram índice de similaridade (IS) superior a 90% e que obtiveram um índice de retenção próximo ao da literatura.

Os resultados do CG-EM encontram-se na tabela abaixo (Tabela 3):

Tabela 3: Principais substâncias encontradas nas frações apolares do extrato T68 analisado via CG-EM, com similaridade maior que 90%, de acordo com o banco de dados do equipamento.

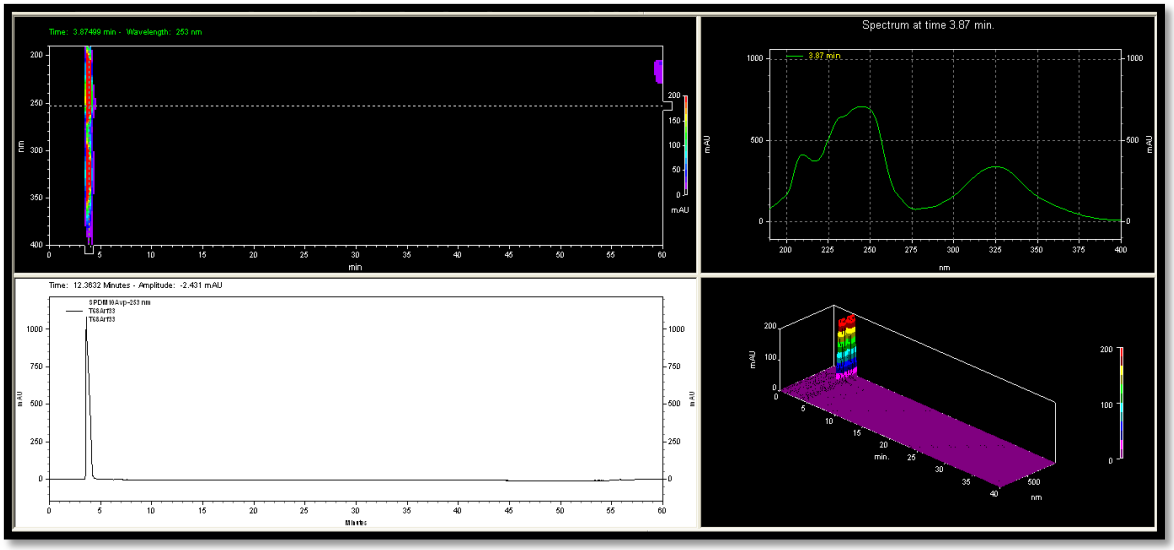
Linhagem	Componente	Tempo de retenção (min)	Similaridade (%)	Área (%)	Índice de Retenção literatura
T68	2,3-diidro-3,5-diidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona	8,819	91	2,87	1269
T68	desconhecido	9,069	-	2,70	-
T68	1,1' – bisoxi-octano	19,715	97	2,24	1688
T68	desconhecido	21,901	-	6,82	-
T68	Ácido 1,2-benzenodicarboxílico	23,828	93	4,53	1908
T68	Ácido pentadecanóico	25,615	91	8,67	1869
T68	Ácido hexadecanóico	25,717	94	11,10	0
T68	9,12-octadecadienoato de metila	27,550	95	2,46	2093
T68	9-octadecenoato de metila	27,650	94	2,26	2085
T68	Ácido 9-octadecenóico	28,453	94	4,73	0
T68	di-n-octil ftalato	33,749	93	16,33	2832
T68	esqualeno	37,131	95	15,92	2914
T68	desconhecido	40,458	-	2,63	-
T68	desconhecido	45,522	-	3,19	-
T68	desconhecido	49,730	-	2,95	-

4.3 Isolamento e purificação dos metabólitos

4.3.1 Isolamento e identificação estrutural da substância T68ARf33

A fração T68ARf33 apresenta aspecto cristalino (P.f.: 256 °C) com coloração alaranjada, solúvel em hexano, acetato de etila, metanol, clorofórmio e acetona. Em análise por CLAE-DAD, observou-se o tempo de retenção 3,9 minutos, com bandas de absorção em UV λ 245 e 325 nm (figura 12)**.** Sua determinação estrutural foi baseada nos espectros de RMN de 1H, COSY, HSQC e HMBC, na frequência de 500 MHz, utilizando solvente deuterado $CDCl_3$ (Figuras 13 a 16 e Tabela 4).

Figura 12: Cromatograma obtidos via análise em CLAE-DAD da substância T68ARf33, λ = 254 nm.



Na análise em alta resolução da amostra, o íon observado foi $[M+H]^+$ *m/z* 325,0657 em modo positivo (figura 17**)**. Ainda, foi verificado, em modo positivo, a formação de dímero sodiado $[2M + Na]^+$ *m/z* 671,0976 e trímero sodiado $[3M+Na]^+$ *m/z* 985,3130.

Figura 13: Espectro de RMN de ^{1}H da substância T68ARf33, 500 MHz, solvente $CDCl_3$.

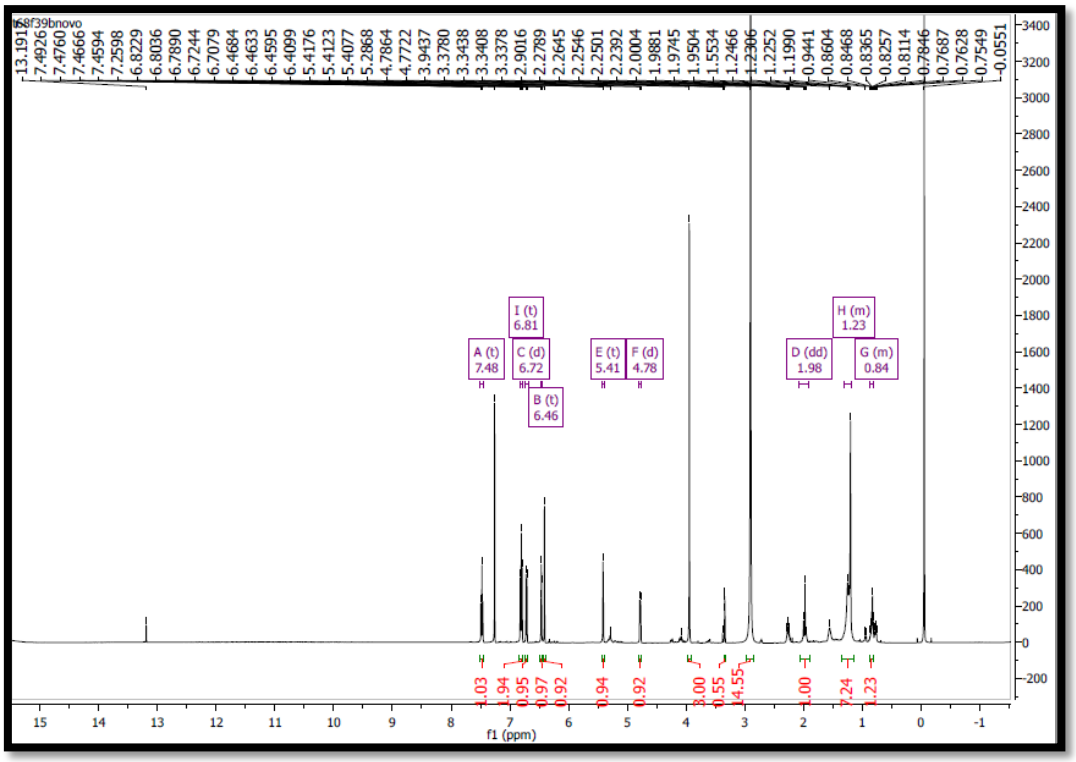


Figura 14: Espectro de RMN de ^{1}H expandido da substância T68ARf33, 500 MHz, solvente $CDCl_3$.

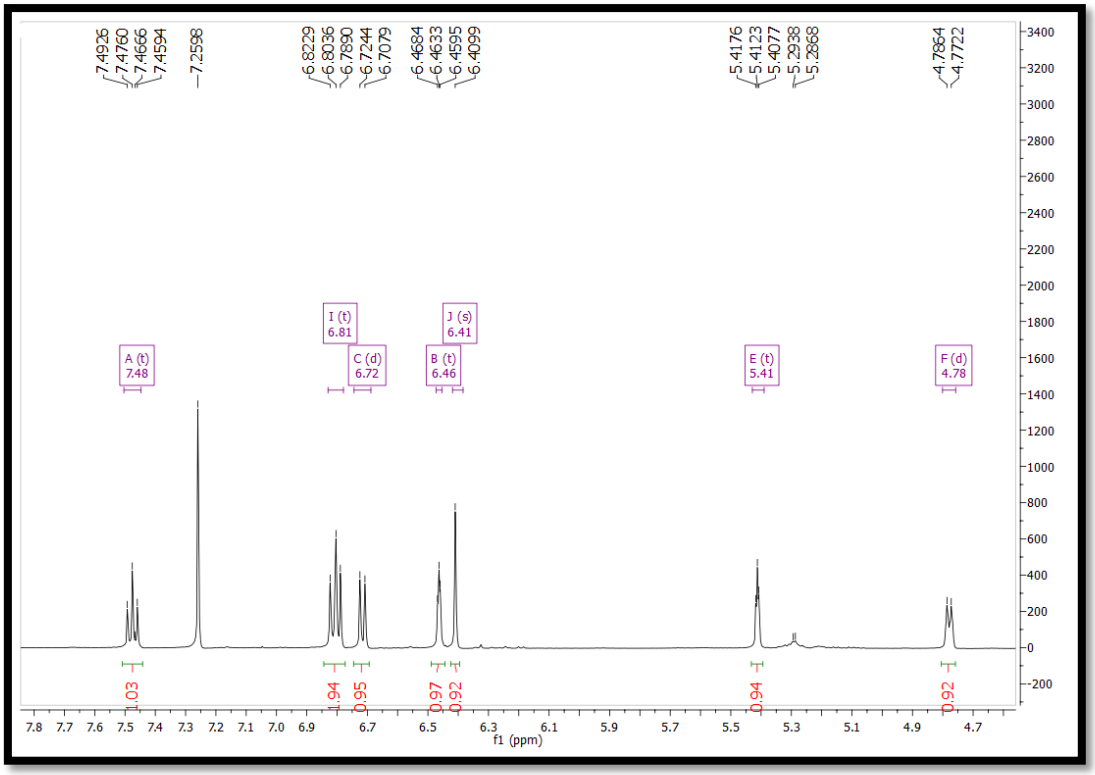


Figura 15: Espectro de RMN HSQC da substância T68ARf33, 500 MHz, solvente $CDCl_3$.

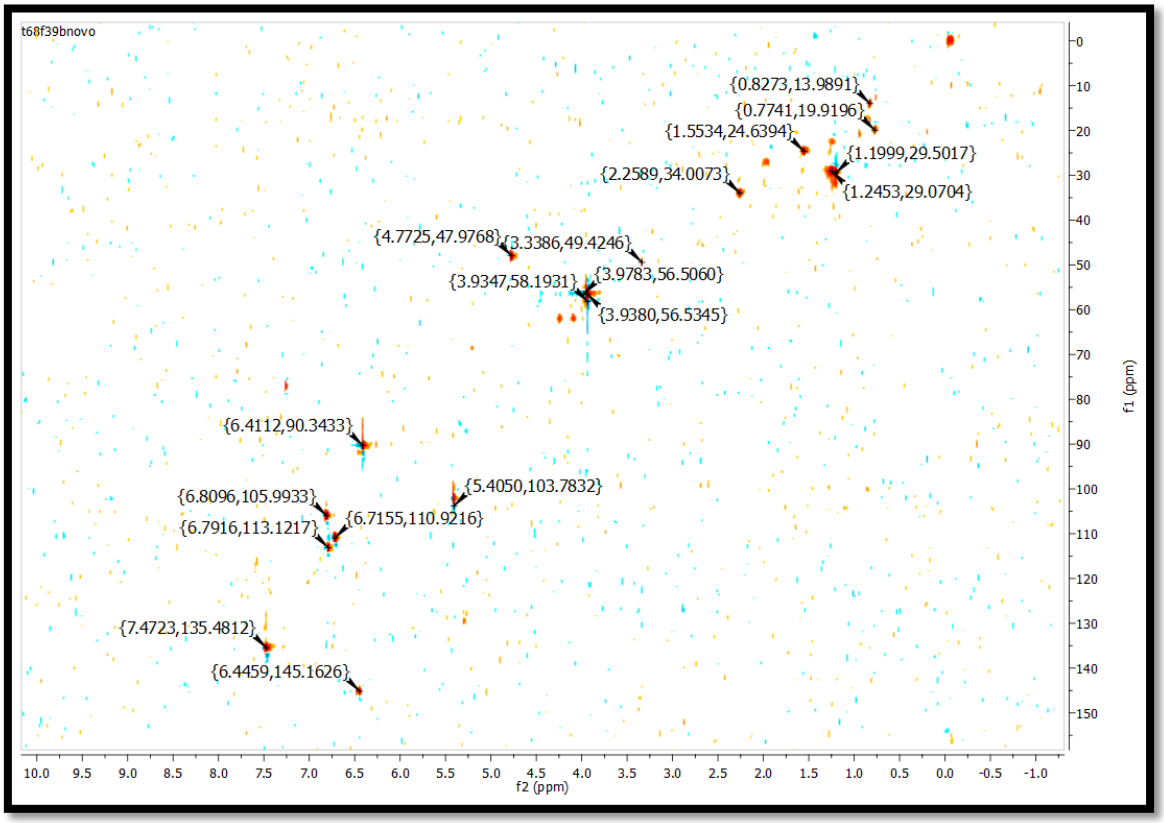


Figura 16: Espectro de RMN HMBC da substância T68ARf33, 500 MHz, solvente $CDCl_3$.

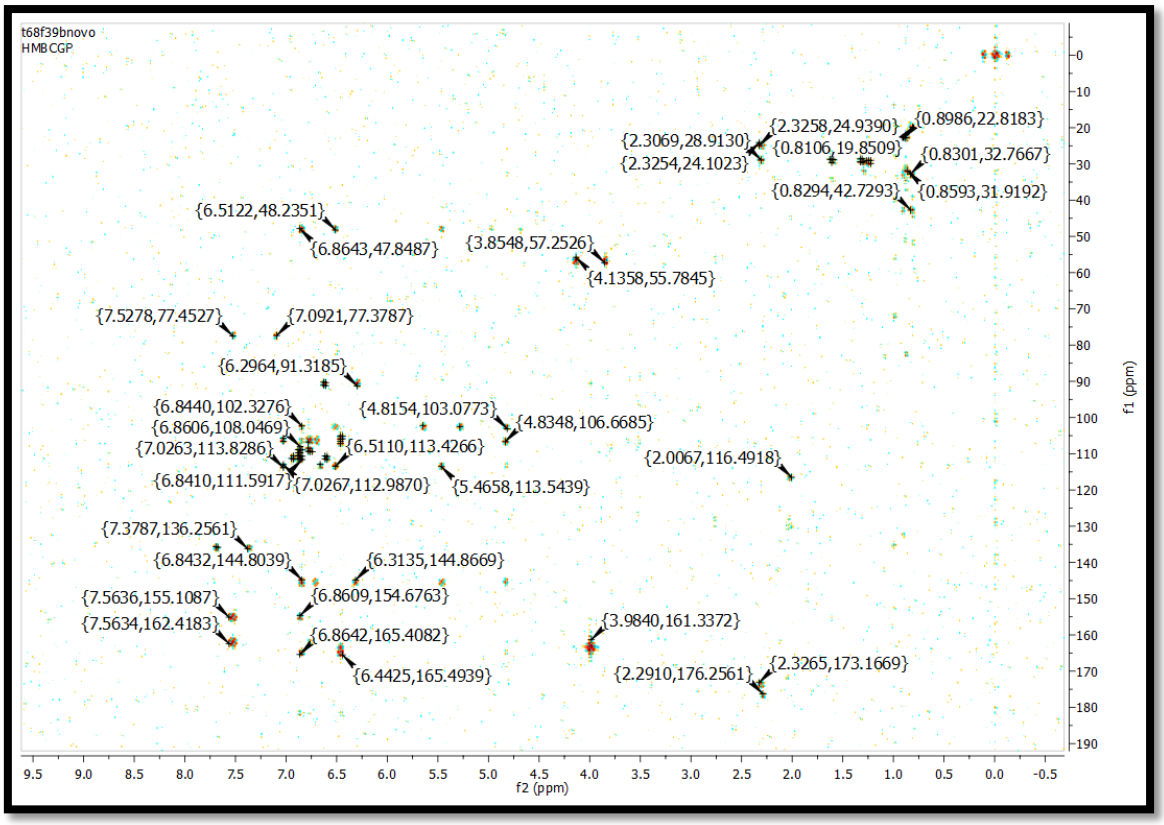
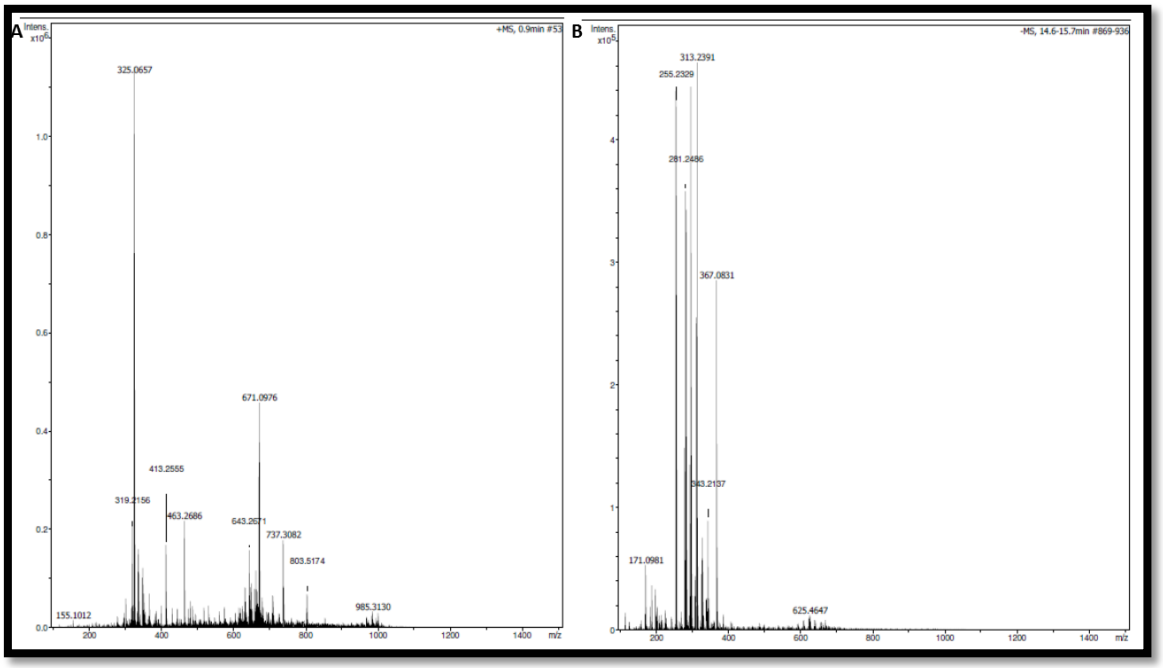


Figura 17: EM em alta resolução, obtido da substância T68ARf33, a partir do fungo T68. Em **(A)** full scan em modo positivo; em **(B)** full scan em modo negativo. *m/z* 324.



Por se tratar de uma amostra também solúvel em n-hexano, foi realizada uma análise em CG-EM a fim de buscar nas substâncias já descritas na

literatura e bancos de dados alguma similaridade com a substância isolada. O índice de similaridade encontrado, entretanto, foi de 67 % para três compostos, sendo todos eles, compostos derivados da classe das xantonas.

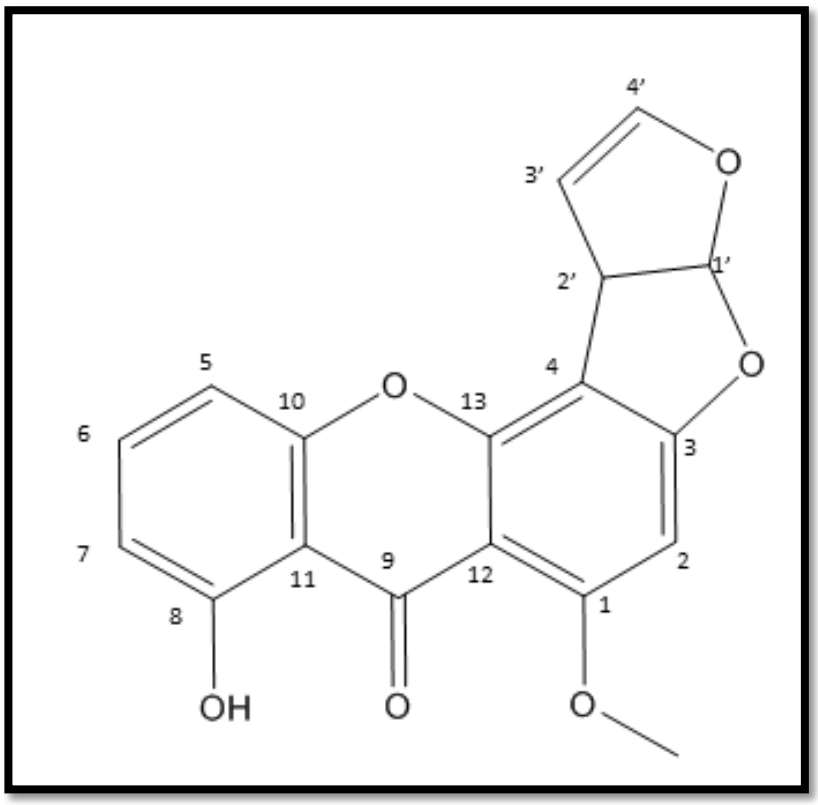
Através de desreplicação, utilizando os bancos de dados Marinlit® e Dicionário de Produtos Naturais e comparando dados espectroscópicos de diferentes tipos de xantonas já isoladas com o espectro de ^{1}H obtido do composto T68ARf33 (Tabela 4), foi possível identificar a substância Esterigmatocistina (CAI et al., 2011) (Figura 18), uma micotoxina com grande potencial carcinogênico, segundo a IARC (HUANG et al., 2014; IARC, 1976).

Tabela 4: Comparação espectroscópica entre amostra T68ARf33 e a micotoxina Esterigmatocistina.

Posição	**T68ARf33 ^{1}H**	**T68ARf33 ^{13}C**	**Esterigmatocistina ^{1}H (Literatura)**	**Esterigmatocistina ^{13}C (Literatura)**
	δ_H (mult. J em Hz) ($CDCl_3$, 500 MHz)	δ_H (mult. J em Hz) ($CDCl_3$, 500 MHz)	δ_H (mult. J em Hz) ($CDCl_3$), 600 mhZ	δ_H (mult. J em Hz) ($CDCl_3$), 600 MHz
1	-	163,1	-	163,3
2	6,41 (s)	90,3	6,45 (s)	90,6
3	-	165,4	-	164,6
4	-	107,2	-	106,8
5	6,81 (t; 8,5)	106,0	6,94 (brs)	106,4
6	7,48 (t; 8,3)	135,5	7,61 (dd; 8,2; 8,3)	136,1
7	6,72 (d; 8,3)	110,9	6,73 (dd; 8,1; 1,1)	110,7
8	-	161,0	-	161,4
9	-	174,2	-	180,4
10	-	155,3	-	154,5
11	-	109,7	-	108,2
12	-	103,0	-	104,5
13	-		-	153,1

OCH_3	3,94 (s)	56,5	3,89 (s)	56,7
1’	6,81 (t; 8,5)		6,61 (d; 6,1)	113,8
2’	4,78 (d; 7,1)	48,0	4,22 (dd; 9,4; 6,6)	41,9
3’	5,41 (t; 2,5)	103,8	5,51 (dd; 2,5; 2,5)	102,6
4’	6,44 (t; 2,2)	145,2	6,50 (dd; 2,0; 2,5)	145,3
OH	13,19 (s)	-	13,4 (s)	-

Figura 18: Estrutura química da micotoxina Esterigmatocistina.



4.2.3 Isolamento e identificação estrutural da fração T68ARf60

No estudo da fração T68AR60, após otimização da escala analítica, foi realizada separação em escala semi-preparativa para purificação das substâncias, conforme descrito no item 3.5.2.2. Foram coletadas amostras

correspondentes ao tempo de retenção 53 minutos (T68ARf60_a) e 67 minutos (T68ARf60_b) (figura 19). Com as análises espectrométricas por IES-MS micro-TOF em alta resolução, foi observado para T68ARf60_a, em modo positivo as razões massa-carga $[M+Na]^+$ *m/z* 487,1090 e $[2M+Na]^+$ *m/z* 951,2330 (figura 20); para T68ARf60_b, observou-se em modo positivo as razões massa-carga $[M+Na]^+$ *m/z* 470,1838 e $[2M+Na]^+$ *m/z* 917,3787 (figura 21). Foram obtidos ainda, os dados espectroscópicos de ambas as amostras, de maneira que as substâncias estão em fase de identificação estrutural.

Figura 19: Cromatograma obtido via análise semi-preparativa em CLAE-DAD da fração T68ARf60, λ = 254 nm.

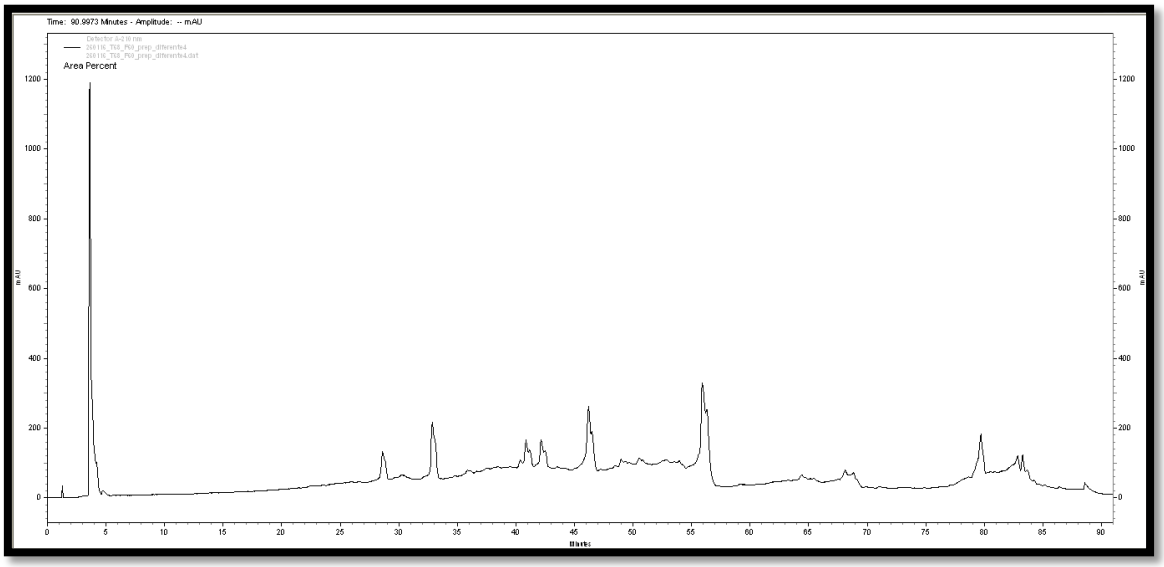


Figura 20: EM em alta resolução, obtido da substância T68ARf60_a, a partir do fungo T68[M+Na]$^+$ *m/z* 487,1090 e [2M+Na]$^+$ *m/z* 951,2330.

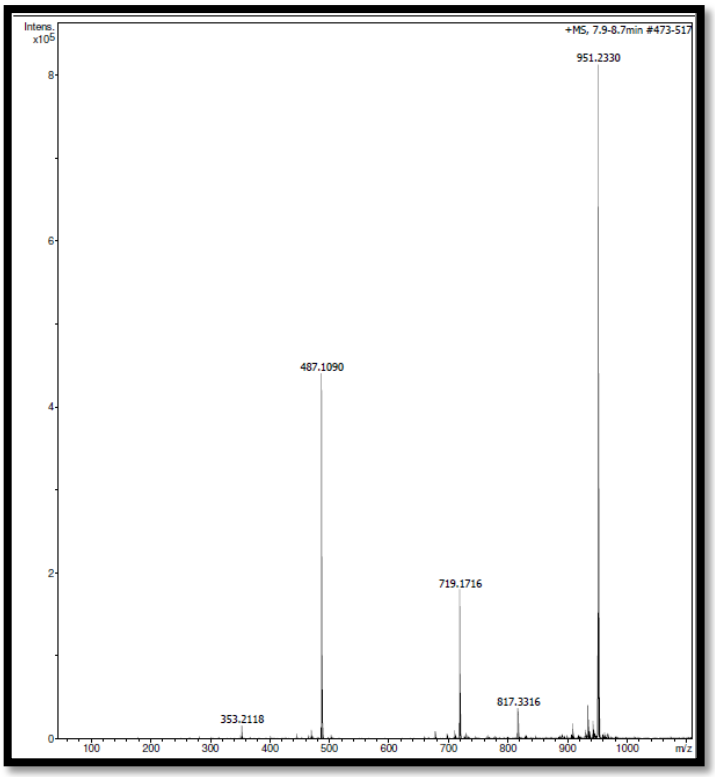
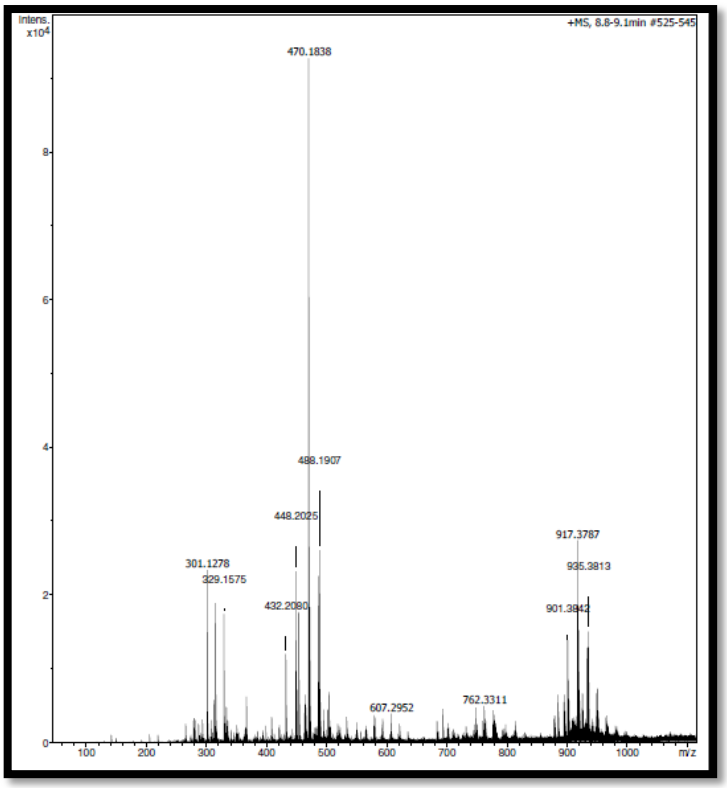


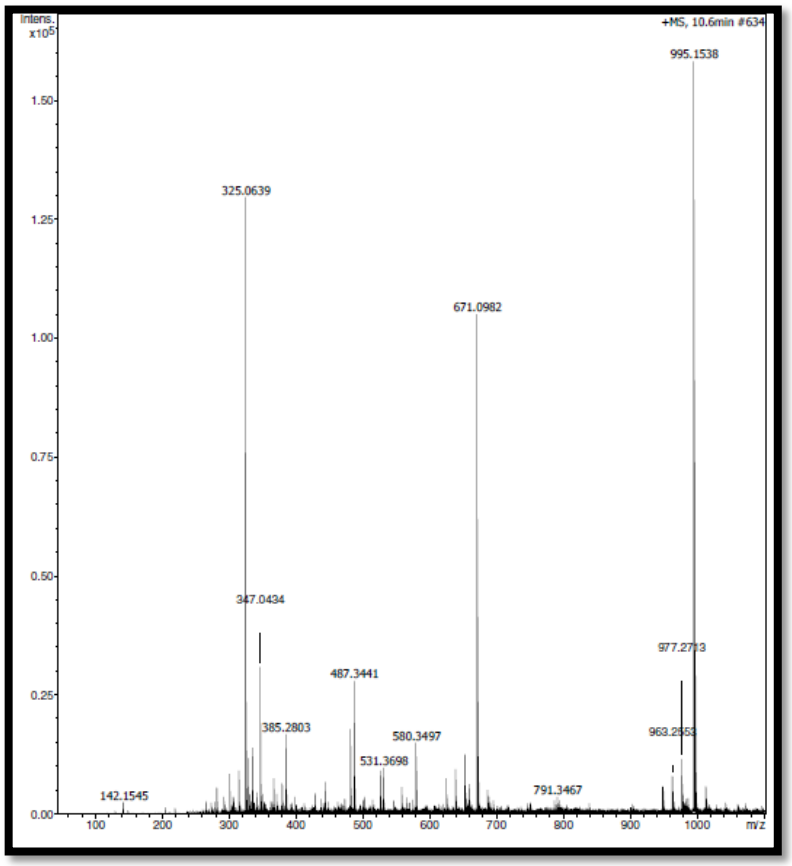
Figura 21: EM em alta resolução, obtido da substância T68ARf60_b, a partir do fungo T68[M+Na]$^+$ *m/z* 470,1838 e [2M+Na]$^+$ *m/z* 917,3787.



4.4 Isolamento e identificação da fração T68C139ARf

No estudo da fração T68C139AR60, proveniente da co-cultura, após otimização da escala analítica, foi realizada separação em escala semi-preparativa para purificação das substâncias, conforme descrito no item 3.5.2.3. Foram coletadas amostras correspondentes ao pico com tempo de retenção em 78 minutos (T6C139ARf56_a) (figura 22). Com as análises espectrométricas por IES-MS micro-TOF em alta resolução, o íon observado foi $[M+H]^+$ *m/z* 325,0657 em modo positivo (figura 23**)**. Ainda, foi verificado, em modo positivo, a formação de dímero sodiado $[2M + Na]^+$ *m/z* 671,0976 e trímero sodiado $[3M+Na]^+$ *m/z* 985,3130, o mesmo perfil espectrométrico da substância esterigmatocistina, isolada na cultura do fungo T68. Com a realização da análise espectroscópica de ^1H uni e bidimensional, foi possível identificar que a micotoxina foi identificada e isolada também na co-cultura entre fungo T68 e cianobactéria CENA139.

Figura 22: EM em alta resolução, obtido da substância T68C139ARf56_a, a partir da co-cultura fungo T68 a cianobactéria CENA139. *m/z* 324.



4.5 Avaliação das atividades biológicas dos extratos e frações

4.5.1 Avaliação da Atividade Antibacteriana

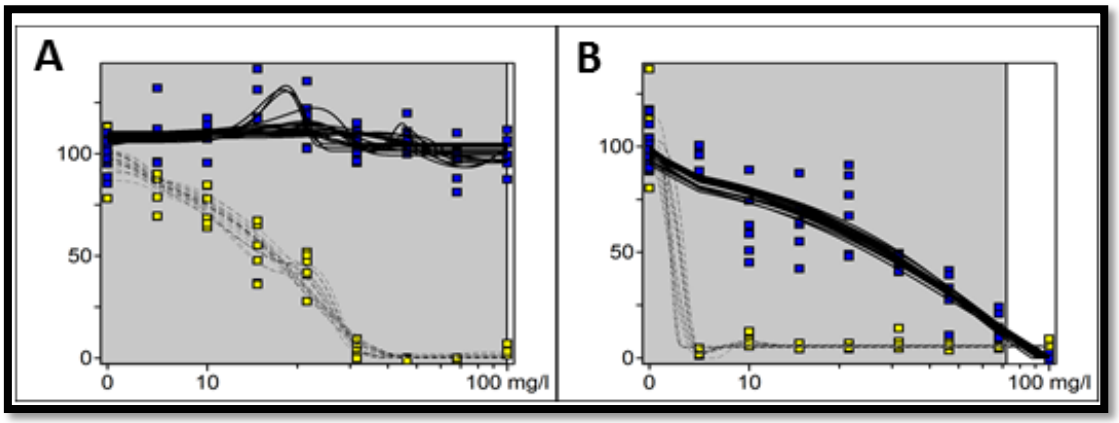
Para a atividade antibacteriana foram testados os extratos brutos T68, CENA139 e T68CENA139. Entretanto, nenhuma das amostras avaliadas apresentou atividade frente às linhagens de bactérias testadas (item 3.6.1).

4.5.2 Avaliação de Fototoxicidade

O extrato bruto do fungo T68 foi considerado fototóxico (MPE = 0,677), enquanto a substância T68ARf33 foi considerada fototóxica e citotóxica (MPE: 0,321; EC-UV: 28,609 µg/mL; EC+UV: 3,530 µg/mL). Como identificada anteriormente, a substância T68ARf33, isolada como substância majoritário, pertence à classe das xantonas, conhecida por apresentar atividade citotóxica frente a diferentes linhagens tumorais (TANG et al., 2015), sendo inédita, entretanto a atividade fototóxica da xantona (figura 23).

Ainda, em um estudo preliminar prévio, realizado pelo doutor Rafael de Felício durante seu doutoramento, foi identificada a produção de citocalasina D, substância potencialmente citotóxica e fototóxica, corroborando para a resposta da atividade fototóxica apresentada pelo extrato bruto T68.

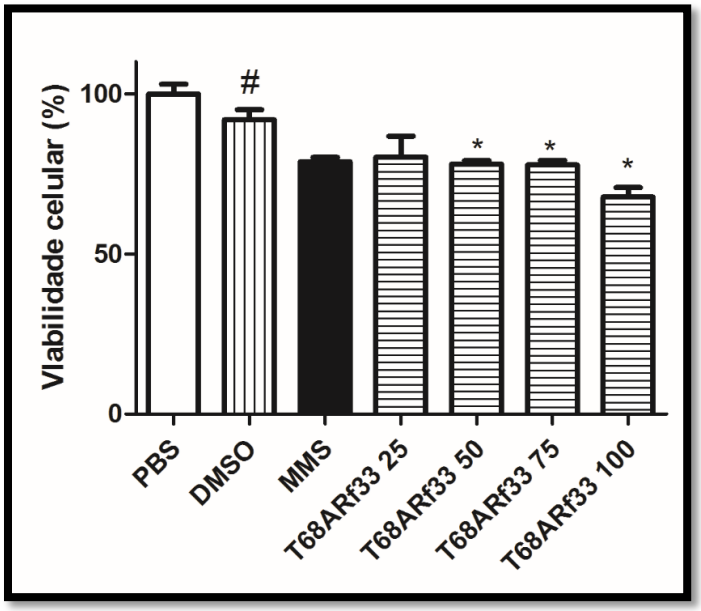
Figura 23: Viabilidade celular de células 3T3 no ensaio de fotoxicidade, em **(A)** após tratamento com amostra T68ARf33 (0,1-100 µg/mL) e em **(B)** após tratamento com o extrato bruto em meio arroz do fungo T68. Nos gráficos, os pontos em azul representam os dados no ensaio em ausência de radiação ultravioleta (-UV), enquanto os pontos em amarelo representam o ensaio em presença de radiação ultravioleta (+UV).



4.5.3 Ensaio de citotoxicidade por MTT em células tumorais HepG2

O ensaio do MTT foi realizado a fim de analisar o potencial citotóxico da amostra. O ensaio consiste em avaliar a atividade mitocondrial em células viáveis, através da redução do brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol2-il]-2,5-difeniltetrazólio, sal solúvel de cor amarela, em um sal insolúvel, conhecido por azul de formazan (MOSMANN, 1983), reação catalisada através da enzima succinato desidrogenase. Assim, verificou-se que a amostra T68ARf33 apresentou citotoxicidade frente à linhagem tumoral HepG2, entre as concentrações testadas 50 e 100 µg/mL (figura 24), corroborando o potencial citotóxico apresentados por substâncias da classe das xantonas (DAVIS; PIERENS, 2006). O ensaio MTT é importante, pois, juntamente com o ensaio do cometa, a ser realizado nas próximas etapas, são eficientes ferramentas na descoberta de novas drogas, avaliando a viabilidade celular, bem como o dano causado ao DNA celular, respectivamente, podendo predizer se o composto pode ser considerado como um futuro candidato a pesquisas como ensaios pré-clínicos de desenvolvimento (CUSTER; SWEDER, 2008; KRAMER; SAGARTZ; MORRIS, 2007).

Figura 24: Viabilidade celular de HepG2 no ensaio MTT após tratamento com amostra T68ARf33 (25-100 µg/mL). Dados: média ± DP de três experimentos independentes. *: diferente estatisticamente do grupo controle solvente dimetilsulfoxido (DMSO 1% V/V); # controle positivo metil metano sulfonato (MMS 200 µM) diferente estatisticamente do grupo controle negativo tampão fosfato (PBS); $p < 0,05$, ANOVA-Dunnett.



Conclusões

–VI –

CONCLUSÕES

O estudo químico do fungo T68 Xylariaceae mostrou-se promissor, apontando para possível patogenicidade, uma vez que foi possível isolar a micotoxina esterigmatocistina, da classe das xantonas, bastante estudada devido ao potencial biológico.

Ainda, o estudo foi promissor em mostrar a interação ecológica ocorrida durante a co-cultura entre a cianobactéria *Cyanobium* sp. CENA139 e o fungo T68, uma clara competição, prevalecendo a cultura do fungo em detrimento da cianobactéria, produzindo novamente micotoxinas.

O estudo foi promissor ainda quanto ao potencial biolótico, uma vez que o extrato fúngico mostrou-se ativo tanto para fototoxicidade frente à linhagem 3T3, e a esterigmatocistina para fototoxicidade quanto para citotoxicidade frente às células tumorais HepG2.

Considerando que o estudo de cianobactérias de origem marinha no Brasil ainda é relativamente recente, o presente trabalho realizado no grupo de pesquisa de Química Orgânica do Ambiente Marinho, analisando as culturas isoladas e a co-cultura, tem muito a acrescentar à sociedade científica com os novos achados ao término deste projeto.

Referências

ANGELIS, S., et al. Co-culture of microalgae, cyanobacteria, and macromycetes for exopolysaccharides production: process preliminary optimization and partial characterization. **Appl Biochem Biotechnol** v. 167, n. 5, p. 1092-1106, 2012.

ARAUJO, L. W., et al. Manual: Isolamento de Micro-organismos endofíticos. Piracicaba: Ed. USP-ESALQ. 88p p. 2002.

BELLEM, F.; NUNES, S.; MORAIS, M. Cyanobacteria toxicity: potential public health impact in South Portugal populations. **J Toxicol Environ Health A** v. 76, n. 4-5, p. 263-271, 2013.

BERLINCK, R. G., et al. Challenges and rewards of research in marine natural products chemistry in Brazil. **J Nat Prod** v. 67, n. 3, p. 510-522, 2004.

BLUNT, J. W., et al. Marine natural products. **Nat Prod Rep** v. 32, n. 2, p. 116-211, 2015.

BLUNT, J. W., et al. Marine natural products. **Nat Prod Rep** v. 27, n. 2, p. 165-237, 2010.

BOUDREAU, P. D., et al. Viequeamide A, a cytotoxic member of the kulolide superfamily of cyclic depsipeptides from a marine button cyanobacterium. **J Nat Prod** v. 75, n. 9, p. 1560-1570, 2012.

CAI, S., et al. Sterigmatocystins from the deep-sea-derived fungus Aspergillus versicolor. **J Antibiot** v. 64, n. 2, p. 193-196, 2011.

CARMICHAEL, W. W. Cyanobacterial secondary metabolites- the cyanotoxins. **Journal of Applied Bacteriology** v. 72, p. 445-459, 1992.

CASTELANI, A. Further Researches on the long viability and growth of many pathogenic fungi and some bacteria in sterille distilled water. **Mycol. Appl** v. v. 20, p. p. 1-6, 1963.

CAVALCANTI, B. C., et al. Cytotoxicity and genotoxicity of ingenamine G isolated from the Brazilian marine sponge Pachychalina alcaloidifera. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol** v. 147, n. 4, p. 409-415, 2008.

CHOI, H.; PEREIRA, A. R.; GERWICK, W. The chemistry of marine algae and cyanobacteria. 1st edn ed. Dordrecht: Springer. p. 2012.

CUSTER, L. L.; SWEDER, K. S. The role of genetic toxicology in drug discovery and optimization. **Curr Drug Metab** v. 9, n. 9, p. 978-985, 2008.

DAVID, B.; WOLFENDER, J.-L.; DIAS, D. A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. **Phytochemistry Reviews** v. 14, n. 2, p. 299-315, 2015.

DAVIS, R. A.; PIERENS, G. K. 1H and 13C NMR assignments for two new xanthones from the endophytic fungus Xylaria sp. FRR 5657. **Magnetic Resonance in Chemistry** v. 44, n. 10, p. 966-968, 2006.

DE FELICIO, R., et al. Trypanocidal, leishmanicidal and antifungal potential from marine red alga Bostrychia tenella J. Agardh (Rhodomelaceae, Ceramiales). **J Pharm Biomed Anal** v. 52, n. 5, p. 763-769, 2010.

FLOREZ, L. V., et al. Defensive symbioses of animals with prokaryotic and eukaryotic microorganisms. **Nat Prod Rep** v. 32, n. 7, p. 904-936, 2015.

GERWICK, W. H.; FENNER, A. M. Drug discovery from marine microbes. **Microb Ecol** v. 65, n. 4, p. 800-806, 2013.

GERWICK, W. H.; MOORE, B. S. Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology. **Chem Biol** v. 19, n. 1, p. 85-98, 2012.

HUANG, S., et al. Impairment of cell cycle progression by sterigmatocystin in human pulmonary cells in vitro. **Food Chem Toxicol** v. 66, p. 89-95, 2014.

IARC. Sterigmatocystin. **IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Man** v. 10, p. 245-251, 1976.

KAEBERNICK, M.; NEILAN, B. A. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. **FEMS Microbiol Ecol** v. 35, n. 1, p. 1-9, 2001.

KRALJ, A., et al. Arugosins G and H: prenylated polyketides from the marine-derived fungus Emericellanidulans var. acristata. **J Nat Prod** v. 69, n. 7, p. 995-1000, 2006.

KRAMER, J. A.; SAGARTZ, J. E.; MORRIS, D. L. The application of discovery toxicology and pathology towards the design of safer pharmaceutical lead candidates. **Nat Rev Drug Discov** v. 6, n. 8, p. 636-649, 2007.

LEAO, P. N., et al. Antitumor activity of hierridin B, a cyanobacterial secondary metabolite found in both filamentous and unicellular marine strains. **PLoS One** v. 8, n. 7, p. e69562, 2013.

LIEBSCH, M., et al. UV-induced effects. **Altern Lab Anim** v. 33 Suppl 1, p. 131-146, 2005.

LININGTON, R. G., et al. Antimalarial peptides from marine cyanobacteria: isolation and structural elucidation of gallinamide A. **J Nat Prod** v. 72, n. 1, p. 14-17, 2009.

LOZA, V.; PERONA, E.; MATEO, P. Molecular fingerprinting of cyanobacteria from river biofilms as a water quality monitoring tool. **Appl Environ Microbiol** v. 79, n. 5, p. 1459-1472, 2013.

MAYER, A. M., et al. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. **Trends Pharmacol Sci** v. 31, n. 6, p. 255-265, 2010.

MELO, R. S.; NEVES, M. H. B.; BAPTISTA, O. R. Cultivo axênico das cianobactérias marinhas Aphanothece halophytica Frémy, 1933 e Chroococcus minutus (Kützing) Nägeli, 1849. **Acta Botanica Brasilica** v. 25, p. 234-240, 2011.

MEVERS, E.; BYRUM, T.; GERWICK, W. H. Parguerene and precarriebowmide, two classes of lipopeptides from the marine cyanobacterium Moorea producens. **J Nat Prod** v. 76, n. 9, p. 1810-1814, 2013.

MEVERS, E., et al. Lipopeptides from the tropical marine cyanobacterium Symploca sp. **J Nat Prod** v. 77, n. 4, p. 969-975, 2014.

MILLER, B., et al. The marine cyanobacterial metabolite gallinamide A is a potent and selective inhibitor of human cathepsin L. **J Nat Prod** v. 77, n. 1, p. 92-99, 2014.

MOHAMED, Z. A.; HASHEM, M.; ALAMRI, S. A. Growth inhibition of the cyanobacterium Microcystis aeruginosa and degradation of its microcystin toxins by the fungus Trichoderma citrinoviride. **Toxicon** v. 86, p. 51-58, 2014.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods** v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NISA, H., et al. Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: A review. **Microb Pathog** v. 82, p. 50-59, 2015.

NUNNERY, J. K.; MEVERS, E.; GERWICK, W. H. Biologically active secondary metabolites from marine cyanobacteria. **Curr Opin Biotechnol** v. 21, n. 6, p. 787-793, 2010.

PAPAZI, A., et al. Lichen symbiosis: nature's high yielding machines for induced hydrogen production. **PLoS One** v. 10, n. 3, p. e0121325, 2015.

PENESYAN, A.; KJELLEBERG, S.; EGAN, S. Development of novel drugs from marine surface associated microorganisms. **Mar Drugs** v. 8, n. 3, p. 438-459, 2010.

PEREIRA, A. R., et al. The carmaphycins: new proteasome inhibitors exhibiting an alpha,beta-epoxyketone warhead from a marine cyanobacterium. **Chembiochem** v. 13, n. 6, p. 810-817, 2012.

PEREIRA, R. C.; SOARES-GOMES, A. S. Biologia Marinha. Editora Interciência. p. 2009.

SALVADOR, L. A., et al. Potent elastase inhibitors from cyanobacteria: structural basis and mechanisms mediating cytoprotective and anti-inflammatory effects in bronchial epithelial cells. **J Med Chem** v. 56, n. 3, p. 1276-1290, 2013.

SANT'ANNA, C. L., et al. Identificação e contagem de cianobactérias planctônicas de águas continentais brasileiras.: Editora Interciência. 58 p. 2006.

SANTOS, C. A.; REIS, A. Microalgal symbiosis in biotechnology. **Appl Microbiol Biotechnol** v. 98, n. 13, p. 5839-5846, 2014.

SCHERLACH, K.; GRAUPNER, K.; HERTWECK, C. Molecular bacteria-fungi interactions: effects on environment, food, and medicine. **Annu Rev Microbiol** v. 67, p. 375-397, 2013.

SCHUMACHER, M., et al. Gold from the sea: marine compounds as inhibitors of the hallmarks of cancer. **Biotechnol Adv** v. 29, n. 5, p. 531-547, 2011.

SILVA, C. S., et al. Phylogeny of culturable cyanobacteria from Brazilian mangroves. **Syst Appl Microbiol** v. 37, n. 2, p. 100-112, 2014.

SINGH, R. K., et al. Cyanobacteria: an emerging source for drug discovery. **J Antibiot (Tokyo)** v. 64, n. 6, p. 401-412, 2011.

STROBEL, G., et al. Natural products from endophytic microorganisms. **J Nat Prod** v. 67, n. 2, p. 257-268, 2004.

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

TAN, L. T.; OKINO, T.; GERWICK, W. H. Bouillonamide: a mixed polyketide-peptide cytotoxin from the marine cyanobacterium Moorea bouillonii. **Mar Drugs** v. 11, n. 8, p. 3015-3024, 2013.

TANG, Z.-Y., et al. Four new cytotoxic xanthones from Garcinia nujiangensis. **Fitoterapia** v. 102, p. 109-114, 2015.

UZAIR, B., et al. Exploring marine cyanobacteria for lead compounds of pharmaceutical importance. **ScientificWorldJournal** v. 2012, p. 179782, 2012.

VAN APELDOORN, M. E., et al. Toxins of cyanobacteria. **Mol Nutr Food Res** v. 51, n. 1, p. 7-60, 2007.

WREDE, D., et al. Co-cultivation of fungal and microalgal cells as an efficient system for harvesting microalgal cells, lipid production and wastewater treatment. **PLoS One** v. 9, n. 11, p. e113497, 2014.

YANG, J. Y., et al. Molecular networking as a dereplication strategy. **J Nat Prod** v. 76, n. 9, p. 1686-1699, 2013.

ZEGURA, B.; STRASER, A.; FILIPIC, M. Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins - a review. **Mutat Res** v. 727, n. 1-2, p. 16-41, 2011.

ZHANG, Y.; LI, X. M.; WANG, B. G. Nigerasperones A approximately C, new monomeric and dimeric naphtho-gamma-pyrones from a marine alga-derived endophytic fungus Aspergillus niger EN-13. **J Antibiot (Tokyo)** v. 60, n. 3, p. 204-210, 2007.

Sterigmatocystin. **IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Man** v. 10, p. 245-251, 1976.