UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo químico de cianobactérias marinhas e do cultivo misto entre a linhagem *Geitlerinema* sp CENA556 e o fungo *Trichoderma atroviride*, endófito da alga marinha *Bostrychia tenella*

Ezequiane Machado da Silva

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas no dia 26/08/2016. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto 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.

Silva, Ezequiane Machado.

Estudo químico de cianobactérias marinhas e do cultivo misto entre a linhagem *Geitlerinema* sp CENA556 e o fungo *Trichoderma atroviride*, endófito da alga marinha *Bostrychia tenella*. Ribeirão Preto, 2016.

148 p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Debonsi, Hosana Maria.

1. Produtos naturais marinhos. 2. Nucleosídeos. 3. Sideróforos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ezequiane Machado da Silva

Estudo químico de cianobactérias marinhas e do cultivo misto entre a linhagem *Geitlerinema* sp CENA556 e o fungo *Trichoderma atroviride*, endófito da alga marinha *Bostrychia tenella*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador(a): Profa. Dra. Hosana Maria Debonsi

Aprovado em: 26/08/2016

	Banca Examinadora	
Prof. Dr		
Instituição:	Assinatura:	
Prof. Dr		
Instituição:	Assinatura:	
Prof. Dr		
Instituição:	Assinatura:	
Prof. Dr		
Instituição:	Assinatura:	
Prof. Dr		
Instituição:	Assinatura:	

Dedico àqueles que mais sinceramente vibraram com minhas vitórias e padeceram meus pesares: meus pais Ezequias e Leila. Ao meu amado esposo Paulo Henrique e aos meus filhos Noah e Ruan, razão da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (FCFRP-USP) pela oportunidade.

Ao Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos (NPPNS-FCFRP-USP) pelo apoio técnico.

Ao grupo de Química Orgânica do Ambiente Marinho (QOAM) pelo companheirismo e compartilhamento de experiências, especialmente aos meus queridos amigos Gabriel, Lorene e Olívia.

À Profa. Dra. Hosana Maria Debonsi pela orientação e apoio.

À Profa. Dra. Marli de Fátima Fiore (CENA-USP) e aos doutores Marcelo Gomes Marçal Vieira Vaz e Diego Bonaldo Genuário pela colaboração nos estudos filogenéticos das linhagens de cianobactérias e por todos os conhecimentos repassados.

À Profa. Dra. Niege Araçari Jacometti Furtado pela colaboração nos ensaios de atividade antibacteriana e especialmente à técnica de laboratório Maria Angélica dos Santos Cunha Chellegatti pela prontidão e dedicação na realização das análises.

Aos especialistas de laboratório José Carlos Tomaz, Izabel Cristina Casanova Turatti e Vinícius Palaretti pela realização das análises cromatográficas, espectrométricas e espectroscópicas essenciais para a conclusão deste trabalho.

À CAPES e FAPESP (processo nº 2012/13841-0) pelo apoio financeiro e/ou bolsa.

À todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

SILVA, E. M. Estudo químico de cianobactérias marinhas e do cultivo misto entre a linhagem *Geitlerinema* sp CENA556 e o fungo *Trichoderma atroviride*, endófito da alga marinha *Bostrychia tenella*. 2016. 148 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Organismos marinhos são reconhecidos como um rico reservatório de produtos naturais com estruturas moleculares excepcionais. Neste contexto, cianobactérias e fungos endofíticos emergiram como uma fonte promissora de substâncias bioativas. O objetivo deste trabalho foi buscar por substâncias biologicamente ativas a partir de linhagem de cianobactérias marinhas coletadas em Ubatuba, litoral do estado de São Paulo (Brasil) e explorar o potencial biossintético do fungo Trichoderma atroviride (endófito isolado da alga marinha Bostrychia tenella, coletada nos costões rochosos da Praia de Fortaleza, Ubatuba, SP) por meio do cultivo misto com a linhagem de cianobactéria Geitlerinema sp CENA556. Inicialmente, cinco espécies de cianobactérias marinhas foram isoladas a partir da amostra coletada no litoral de São Paulo e então caracterizadas filogeneticamente. As linhagem codificadas como Geitlerinema sp CENA552 e Geitlerinema sp CENA556 foram cultivadas em meio mimetizando água do mar e em seguida extraídas com uma mistura de CH₂Cl₂/ MeOH (2:1) e em seguida AcOEt. O extrato concentrado foi particionado em fração hexano e fração MeOH/H2O (95: 5). Quatro substâncias conhecidas foram identificadas a partir da fração hexânica do extrato da linhagem Geitlerinema sp CENA552 por análises de CG-EM: 2hexil,1-decanol, 3-octadeceno, neoftadieno e palmitato de metila. A partir da fração hexânica do extrato da linhagem Geitlerinema sp CENA556, foram identificados: dodecanal, 8heptadeceno, palmitaldeído, neoftadieno, fitol, palmitoleato de metila, 7-hexadecenoato de metila e 9-hexadecenoato de metila. Sete substâncias foram isoladas por CLAE-DAD semipreparativa a partir da fração MeOH/H2O (95: 5) do extrato da linhagem Geitlerinema sp CENA556 e identificadas por análises de espectroscopia de RMN e espectrometria de AR-EM. Entre elas, cinco nucleosídeos conhecidos isolados pela primeira vez em cianobactérias: 2'-deoxiuridina, timidina, adenosina, 2'-deoxiadenosina e uridina. Além disso, dois aminoácidos: D-leucina e L-fenilalanina. O fungo Trichoderma atroviride foi cultivado isoladamente em meio arroz e Czapek e os cultivos mistos entre o fungo e a cianobactéria (linhagem Geitlerinema sp CENA556) foram realizados utilizando os mesmos meios de cultura. Os extratos CH2Cl2/ MeOH (2:1) e AcOEt reunidos provenientes do cultivo misto em meio Czapeck do fungo T. atroviride e da cianobactéria Gleiterinema sp CENA556 mostrou diferença significativa na produção de metabólitos quando comparado ao extrato do fungo e da cianobactérias cultivados individualmente. Quatro sideróforos tipo catecol foram isolados da fração MeOH/H2O (95: 5) deste extrato: agrobactina, agrobactina A, fotobactina e uma substância inédita. Agrobactina, a substância majoritária, mostrou atividade antibacteriana substancial frente a P. mirabilis, E. coli, S. saprophyticus, S. aureus e P. aeruginosa. Assim, a cianobactéria brasileira estudada Geitlerinema sp CENA556 mostrou-se promissora para o isolamento de nucleosídeos com atividade biológica. Além disso, o fungo T. atroviride provou ser uma fonte prolífica de sideróforos antimicrobianos obtidos por eliciação biológica com a cyanobactéria Geitlerinema sp CENA556.

Palavras-chave: Produtos naturais marinhos. Nucleosídeos. Sideróforos. Atividade antibacteriana.

ABSTRACT

SILVA, E. M. Chemical exploration of marine cyanobacteria and coculture of the *Geitlerinema* sp CENA556 strain and the fungus *Trichoderma atroviride*, endophyte of seaweed *Bostrychia tenella*. 2016. 148 p. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Marine organisms are recognized as a rich reservoir of natural products with exceptional molecular structures. In this context, cyanobacteria and endophytic fungi has emerged as source of promising bioactive compounds. The aim of this work was to look for biologically active compounds from the marine cyanobacteria strains, collected in Ubatuba, coast of the São Paulo state (Brazil), and to explore the biosynthetic potential of the fungus Trichoderma atroviride (endophyte isolated from marine seaweed Bostrychia tenella, collected in the rocky Shore of Praia de Fortaleza, Ubatuba, SP) by coculture with the cyanobacteria strain Geitlerinema sp CENA556. Initially, five species of marine cyanobacteria were isolated from the sample collected at the coast of São Paulo, and then characterized phylogenetically. Among them, the strains coded as Geitlerinema sp CENA552 and Geitlerinema sp CENA556 were cultured in mimicking seawater medium and extracted with a mix of CH₂Cl₂/ MeOH (2:1), and then EtOAc. The concentrated extract was partitioned into hexane fraction and MeOH/H2O (95: 5) fraction. Four known compounds were identified from the hexane fraction of the Geitlerinema sp CENA552 extract by GC-MS analysis: 2-hexyl-1-decanol, 3octadecene, neophytadiene, and methyl palmitate. Similarly, the compounds dodecanal, 8heptadecene, palmitaldehyde, neophytadiene, phytol, methyl palmitoleate, methyl 7hexadecenoate, and methyl 9-hexadecenoate were identified from the hexane fraction of the Geitlerinema sp CENA556 extract. Starting of MeOH/H2O (95: 5) fraction of Geitlerinema sp CENA556 extract, seven compounds were isolated by semi preparative HPLC-PDA and identified by NMR spectroscopy and HR-MS analysis. Among them, five known nucleosides first isolated from cyanobacteria: 2'-deoxyuridine, thymidine, adenosine, 2'-deoxyadenosine, and uridine. Also two amino acids: D-leucine and L-phenylalanine. Trichoderma atroviride was grown alone in rice and Czapeck media and the coculture between the fungus and the cyanobacteria (Geitlerinema sp CENA556) were performed using the same media. The CH₂Cl₂/MeOH (2:1) and EtOAc pooled extract from the coculture of the fungus T. atroviride and the cyanobacteria Gleiterinema sp CENA556 in Czapek medium shows significant difference in the metabolites production when compared to individually cultured fungus and cyanobacteria. Four catechol type siderophores were isolated from MeOH/H2O (95: 5) fraction of this extract: agrobactin, agrobactin A, photobactin and one novel compound. Agrobactin, the major compound, showed substantial antibacterial activity against P. mirabilis, E. coli, S. saprophyticus, S. aureus and P. aeruginosa. Thus, the studied brazilian cyanobacteria Geitlerinema sp appeared to be promising for isolation of nucleosides with biological activity. Furthermore, the fungus T. atroviride proved to be a prolific source of antibacterial siderophores obtained by biological elicitation with the cyanobacteria Geitlerinema sp CENA556.

Keywords: Marine natural products. Nucleosides. Siderophores. Antibacterial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aumento do número de publicações contendo a palavra cyanobacteria no	
banco de dados SciFinder®	10
Figura 2. Metabólitos isolados de cianobactérias do gênero Geitlerinema	16
Figura 3. Nucleosídeos marinhos e derivados sintéticos utilizados na clínica	17
Figura 4. Local de realização da coleta do material perifítico contendo	21
cianobactérias	
Figura 5. Fluxograma do isolamento e/ou identificação dos metabólitos produzidos pela	24
linhagem de cianobactéria CENA556	
Figura 6. Fotomicrografias de cianobactérias isoladas do perifíton no litoral brasileiro	26
Figura 7. Ganho de biomassa, expressos em mg, das linhagem CENA552, CENA553,	
CENA554, CENA555 e CENA556, para cada meio de cultura testados	29
Figura 8. Cromatograma da fração metanol/ água (95:5) do extrato da linhagem	
Geitlerinema sp CENA 552 em CLAE-DAD a 253 nm	30
Figura 9. Cromatograma da fração metanol/ água (95:5) do extrato da linhagem	
Geitlerinema sp CENA 556 em CLAE-DAD a 253 nm	30
Figura 10. Nucleosídeos e aminoácidos isolados da linhagem de cianobactéria	
Geitlerinema sp. CENA556	34
Figura 11. Estrutura química de algumas substâncias isoladas de fungos da espécie	
Trichoderma atroviride	40
Figura 12. Fungo endofítico (linhagem T06) isolado a partir da alga marinha <i>B</i> .	
tenella	46
Figura 13. Esquema representando os estágios do cultivo misto entre a cianobactéria	
Geitlerinema sp CENA556 e o fungo T. atroviride T06	48
Figura 14. Aspectos das culturas isolada e mista do fungo T.	
atroviride	51
Figura 15. CCD comparativa das frações MeOH/ H2O (95:5) dos extratos brutos	
obtidos do fungo T. atroviride e da cianobactéria Geitlerinema sp CENA556 isolados e	
em cultivo misto	52
Figura 16. Cromatograma das frações metanol:água (95:5) dos extratos do fungo T.	
atroviride e da cianobactéria Geitlerinema sp CENA556 isolados e em cultivo misto	
em Czapek	53

Figura 17. Cromatograma das frações metanol:água (95:5) dos extratos do fungo T.	
atroviride e da cianobactéria Geitlerinema sp CENA556 isolados e em cultivo misto	
em arroz	53
Figura 18. Cromatograma das frações metanol:água (95:5) dos extratos do fungo T.	
atroviride e da cianobactéria Geitlerinema sp CENA556 isolados e em cultivo misto	
em ASNIII	54
Figura 19. Sideróforos isolados a partir da fração MeOH/ H ₂ O (95:5) do extrato	
T06CENA556_Cz proveniente do cultivo misto	56
Figura 20. Esquema de correlações $COSY^{1}H^{1}H$ e HMBC para a substância (11)	59
Figura 21. Placas dos ensaios de CIM para a substância agrobactina (10) isolada do	
fungo T. atroviride em cultivo misto com a cianobactéria Geiltlerinema sp	
CENA556	62
Figura 22. Árvore filogenética das linhagens de cianobactérias coletadas no litoral de	
São Paulo (Anexo II)	85
Figura 23. Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo positivo) da uridina (1)	
(Anexo III)	86
Figura 24. Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo negativo) da uridina	
(1) (Anexo IV)	87
Figura 25. Espectro de RMN de ¹ H da uridina (1) (Anexo V)	88
Figura 26. Espectro de RMN COSY ¹ H ¹ H da uridina (1) (Anexo VI)	89
Figura 27. Espectro de RMN HSQC da uridina (1) (Anexo VII)	90
Figura 28. Espectro de RMN HMBC da uridina (1) (Anexo VIII)	91
Figura 29. Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo positivo) da 2'-	
deoxiuridina (2) (Anexo IX)	92
Figura 30. Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo negativo) da 2'-	
deoxiuridina (2) (Anexo X)	93
Figura 31. Espectro de RMN de ¹ H da 2'-deoxiuridina (2) (Anexo XI)	94
Figura 32. Espectro de RMN COSY ¹ H ¹ H da 2'-deoxiuridina (2) (Anexo XII)	95
Figura 33. Espectro de RMN HSQC da 2'-deoxiuridina (1) (Anexo XIII)	96
Figura 34. Espectro de RMN HMBC da 2'-deoxiuridina (2) (Anexo XIV)	97
Figura 35. Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo positivo) da timidina	
(3) (Anexo XV)	98
Figura 36. Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo negativo) da timidina	

(3) (Anexo XVI)	99
Figura 37. Espectro de RMN de ¹ H da timidina (3) (Anexo XVII)	100
Figura 38. Espectro de RMN COSY ¹ H ¹ H da timidina (3) (Anexo XVIII)	101
Figura 39. Espectro de RMN HSQC da timidina (3) (Anexo XIX)	102
Figura 40. Espectro de RMN HMBC da timidina (3) (Anexo XX)	103
Figura 41. Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo positivo) da adenosina	
(4) (Anexo XXI)	104
Figura 42. Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo negativo) da adenosina	
(4) (Anexo XXII)	105
Figura 43. Espectro de RMN de ¹ H da adenosina (4) (Anexo XXIII)	106
Figura 44. Espectro de RMN COSY ¹ H ¹ H da adenosina (4) (Anexo XXIV)	107
Figura 45. Espectro de RMN HSQC da adenosina (4) (Anexo XXV)	108
Figura 46. Espectro de RMN HMBC da adenosina (4) (Anexo XXVI)	109
Figura 47. Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo positivo) da 2'-	
deoxiadenosina (5) (Anexo XXVII)	110
Figura 48. Espectro de RMN de ¹ H da 2'-deoxiadenosina (5) (Anexo XXVIII)	111
Figura 49. Espectro de RMN COSY ¹ H ¹ H da 2'-deoxiadenosina (5) (Anexo XXIX)	112
Figura 50. Espectro de RMN HSQC da 2'-deoxiadenosina (5) (Anexo XXX)	113
Figura 51. Espectro de RMN HMBC da 2'-deoxiadenosina (5) (Anexo XXXI)	114
Figura 52. Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo positivo) da D-leucina	
(6) (Anexo XXXII)	115
Figura 53. Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo negativo) da D-leucina	
(6) (Anexo XXXIII)	116
Figura 54. Espectro de RMN de ¹ H da D-leucina (6) (Anexo XXXIV)	117
Figura 55. Espectro de RMN COSY ¹ H ¹ H da D-leucina (6) (Anexo XXXV)	118
Figura 56. Espectro de RMN HSQC da D-leucina (6) (Anexo XXXVI)	119
Figura 57. Espectro de RMN HMBC da D-leucina (6) (Anexo XXXVII)	120
Figura 58. Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo positivo) da L-	
fenilalanina (7) (Anexo XXXVIII)	121
Figura 59. Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo negativo) da L-	
fenilalanina (7) (Anexo XXXIX)	122
Figura 60. Espectro de RMN de ¹ H da L-fenilalanina (7) (Anexo XL)	123
Figura 61. Espectro de RMN COSY ¹ H ¹ H da L-fenilalanina (7) (Anexo XLI)	124

Figura 62. Espectro de RMN HSQC da L-fenilalanina (7) (Anexo XLII)	125
Figura 63. Espectro de RMN HMBC da L-fenilalanina (7) (Anexo XLIII)	126
Figura 64. Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo positivo) da	
agrobactina A (8) (XLIV)	127
Figura 65. Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo negativo) da	
agrobactina A (8) (Anexo XLV)	128
Figura 66. Espectro de RMN de ¹ H da agrobactina A (8) (Anexo XLVI)	129
Figura 67. Espectro de RMN COSY ¹ H ¹ H da agrobactina A (8) (Anexo XLVII)	130
Figura 68. Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo positivo) da	
fotobactina (9) (Anexo XLVIII)	131
Figura 69. Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo negativo) da	
fotobactina (9) (Anexo XLIX)	132
Figura 70. Espectro de RMN de ¹ H da fotobactina (9) (Anexo L)	133
Figura 71. Espectro de RMN COSY ¹ H ¹ H da fotobactina (9) (Anexo LI)	134
Figura 72. Espectro de RMN HSQC da fotobactina (9) (Anexo LII)	135
Figura 73. Espectro de RMN HMBC da fotobactina (9) (Anexo LIII)	136
Figura 74. Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo positivo) da	
agrobactina (10) (Anexo LIV)	137
Figura 75. Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo negativo) da	
agrobactina (10) (Anexo LV)	138
Figura 76. Espectro de RMN de ¹ H da agrobactina (10) (Anexo LVI)	139
Figura 77. Espectro de RMN COSY ¹ H ¹ H da agrobactina (10) (Anexo LVII)	140
Figura 78. Espectro de RMN HSQC da agrobactina (10) (Anexo LVIII)	141
Figura 79. Espectro de RMN HMBC da agrobactina (10) (Anexo LIX)	142
Figura 80. Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo positivo) da substância	
(11) (Anexo LX)	143
Figura 81. Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo negativo) da substância	
(11) (Anexo XLI)	144
Figura 82. Espectro de RMN de ¹ H da substância (11) (Anexo XLII)	145
Figura 83. Espectro de RMN COSY ¹ H ¹ H da substância (11) (Anexo XLIII)	146
Figura 84. Espectro de RMN HSQC da substância (11) (Anexo LXIV)	147
Figura 85. Espectro de RMN HMBC da substância (11) (Anexo LXV)	148

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Substâncias identificadas na fração hexânica dos extratos das linhagens	
CENA552 e CENA556	32
Tabela 2 – Dados de RMN de ¹ H das substâncias (8), (10) e (11) em CDCl ₃ , 500 MHz e	
valores de referência da para agrobactina A e agrobactina	57
Tabela 3 – Dados de RMN de 13 C das substâncias (10) e (11) em CDCl ₃ , 500 MHz	58
Tabela 4 – Identidade (%) das sequencias de genes RNAr 16S entre as linhagens	
isoladas e outras linhagens de cianobactérias disponíveis no GenBank (Anexo I)	83

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Substâncias de origem marinha e derivados disponíveis comercialmente ou	
em ensaios clínicos	05
Quadro 2 – Exemplos de substâncias isoladas recentemente a partir de cianobactérias	
com atividade biológica	11
Quadro 3 – Meios de cultura utilizados para o cultivo das linhagens isoladas de cianobactérias	20
Quadro 4 – Resultados da atividade antimicrobiana da substância majoritária	
(agrobactin) isolada do fungo T. atroviride T06 em cultivo misto com a linhagem de	
cianobactéria Geitlerinema sp CENA556	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de etila
ANOVA	Análise de variância
ATCC	American Type Culture Collection
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
C8	Octil silano
CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloreto de cálcio dihidratado
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CENA	Centro de Energia Nuclear na Agricultura
CENA552 a CENA556	Código das linhagens de cianobactérias isoladas
CENA552_SWBG-11	Extrato da linhagem CENA552 cultivada em meio SWBG-11
CENA556_ASNIII	Extrato da linhagem CENA556 cultivada em meio ASN III
CENA556T06_ASNIII	Extrato da cultura mista em meio ASN III
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CH_2Cl_2	Diclorometano
CH ₃ CN	Acetonitrila
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de arranjo de diodos
CLAE-EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria
CLAE-RMN	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectroscopia de ressonância magnética nuclear
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CLUE	Cromatografia líquida de ultra eficiência
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	Nitrato de cobre hexahidratado
CO_2	Dióxido de carbono
COSY ¹ H ¹ H	Espectroscopia de correlação de hidrogênio (<i>Correlation</i> Spectroscopy)
CuSO ₄ .5H ₂ O	Sulfato de cobre pentahidratado
DNA	Ácido desoxirribonucleico

EC-EM	Eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas
EM/EM	Espectrometria de massas acoplada a espectrometria de massas
ESI-TOF	Ionização por electrospray com detector por tempo de vôo (Electrospray ionization- Time of flight)
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
FDA	Food and Drug Administration
H ₂ O	Água
H ₃ BO ₃	Ácido bórico
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
ICN	International Code of Nomenclature for Algae, Fungi, and Plants
IK	Índice de retenção de Kovats
m/z	Relação massa/carga
MeOH	Metanol
MgCl ₂ .6H ₂ O	Cloreto de magnésio hexahidratado
MnCl ₂ .4H ₂ O	Cloreto de manganês tetrahidratado
Na ₂ EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético dissódico
Na ₂ Mo ₄ .2H ₂ O	Molibdato de sódio diidratado
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NPPNS	Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos
NRPS	Nonribossomal Peptide Synthase
PCC	Pasteur Culture collection
PCR	Reação de polimerase em cadeia
pН	Potencial hidrogeniônico
PKS	Polyketide synthase
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNAr	Ácido ribonucleico ribossômico
T06_Ar	Extrato do fungo T. atroviride cultivado em meio arroz
T06_Cz	Extrato do fungo T. atroviride cultivado em meio Czapek

T06CENA556_Ar	Extrato da cultura mista em arroz
T06CENA556_Cz	Extrato da cultura mista em meio Czapek
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta
ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de zinco heptahidratado
ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de zinco heptahidratado

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	vii
Lista de quadros	viii
Lista de abreviaturas e siglas	ix
1 INTRODUÇÃO	01
1 1 Ambiente marinho e seus produtos naturais	01
1.2 Abordagens modernas da nesquisa com produtos naturais marinhos	06
1.3 Microrganismos marinhos como fonto inostimával do navos produtos naturais	00
hioptivos	08
121 Cianobactórias marinhas	00
1.2.2 Europa en de fiises de alege marinhas	12
1.5.2 Fungos enaojuicos de algas marinnas	15
2. CAPÍTULO I – Estudo filogenético e químico de linhagens de cianobactérias do	
litoral brasileiro	15
2.1 Introdução	15
2.2 Objetivos	18
2.3 Material e métodos	19
2.3.1 Procedimentos gerais	19
2.3.1.1 Equipamentos e softwares	19
2.3.1.2 Materiais diversos, solventes e meios de cultura	19
2.3.2 Coleta, isolamento e caracterização morfológica e filogenética das linhagens de	
cianobactérias	20
2.3.3 Avaliação e seleção do meio de cultura para as linhagens de cianobactérias e	
manutenção das culturas	22
2.3.4 Cultivo em escala ampliada das linhagens de cianobactéria CENA552 e	
CENA556, extração e análise do perfil químico por CLAE-DAD e CG-EM	23
2.3.5 Isolamento e elucidação estrutural das substâncias majoritárias da fração polar	
do extrato CENA556_ASNIII	24
2.4 Resultados e discussão	25

2.4.1 Caracterização morfológica e filogenética das linhagens de cianobactérias	25
2.4.2 Avaliação e seleção do meio de cultura para as linhagens de cianobactérias	28
2.4.3 Avaliação do perfil químico das frações polar e apolar dos extratos das	
linhagens CENA552 e CENA556 por CLAE-DAD e CG-EM	29
2.4.4 Isolamento e elucidação estrutural das substâncias majoritárias da fração polar	
do extrato CENA556_ASNIII	33
2.5 Conclusões	38

3 CAPÍTULO II - Estudo químico e biológico do cultivo misto entre a	
cianobactéria Geitlerinema sp CENA 556 e o fungo Trichoderma atroviride,	
endófito da alga marinha Bostrychia tenella	39
3.1 Introdução	39
3.2 Objetivos	43
3.3 Material e Métodos	44
3.3.1 Procedimentos gerais	44
3.3.1.1 Equipamentos e softwares	44
3.3.1.2 Solventes, materiais diversos e meios de cultura	44
3.3.2 Microrganismos	45
3.3.3 Cultivos isolados do fungo endofítico T. atroviride e da cianobactéria	
Geitlerinema sp CENA556, extração e caracterização da fração polar MeOH/ H2O	
(95: 5) por CLAE-DAD	46
3.3.4 Cultivos mistos entre a linhagem de cianobactéria Geitlerinema sp CENA556 e o	
fungo T. atroviride T06 e avaliação do perfil químico por CCDC e CLAE-DAD das	
frações polares dos extratos obtidos	47
3.3.5 Isolamento e identificação estrutural das substâncias obtidas da fração polar do	
extrato T06CENA556_Cz proveniente do cultivo misto	49
3.3.6 Avaliação do potencial biológico da substância majoritária purificada a partir	
da fração polar do extrato T06CENA556_Cz	50
3.4 Resultados e discussão	51
3.4.1 Avaliação do perfil dos extratos provenientes do cultivo misto entre a linhagem	
de cianobactéria Geitlerinema sp CENA556 e o fungo T. atroviride T06 e comparação	
com o perfil dos extratos obtidos das culturas dos microrganismos isolados	51
3.4.2 Isolamento e identificação estrutural das substâncias obtidas da fração polar do	

extrato T06CENA556_Cz proveniente do cultivo misto	54
3.4.3 Avaliação do potencial biológico da substância majoritária purificada a partir	
da fração polar do extrato T06CENA556_Cz do cultivo misto	61
3.5 Conclusões	63
REFERÊNCIAS	64
ANEXOS	83

1 INTRODUÇÃO

1.1 Ambiente marinho e seus produtos naturais

A natureza, ao longo da história, tem desempenhado um papel importante para a geração de novos fármacos, seja pelo fornecimento de substâncias bioativas ou de protótipos moleculares para o desenvolvimento de derivados sintéticos, seja inspirando a síntese de novas moléculas relacionadas estruturalmente com o produto natural original. Em decorrência disto, produtos naturais ou derivados destes representam cerca de 48 % do total de fármacos disponibilizados para uso terapêutico entre os anos de 1981 e 2014 (NEWMAN & CRAGG, 2016; DAVID et al., 2015). Um exemplo que vale ressaltar é que 60% dos fármacos com propriedades antitumorais utilizados atualmente são derivados de fontes naturais (GOGINENI et al., 2015).

Tendo em vista a natureza como uma fonte prolífica de produtos naturais, não podemos deixar de que considerar que 95% da biosfera da terra são representados pelo ecossistema marinho e este abriga uma vasta diversidade de organismos, com 300 mil espécies descritas que representam apenas uma discreta parcela do total estimado (GOGINENI et al., 2015; MOGHADAMTOUSI et al., 2015). Além desta diversidade biológica, a imensidão dos oceanos e seu ambiente único são responsáveis também por uma excepcional diversidade química (MOGHADAMTOUSI et al., 2015).

E importante salientar que cada produto não se origina na natureza para servir aos interesses humanos. Estas substâncias comumente aparecem na natureza como produto de vias metabólicas secundárias de organismos, com a finalidade de resistir a restrições ecológicas, regular sua biologia, garantir a sua coexistência e coevolução com outras espécies do meio e/ou aumentar a sua taxa de sobrevida. E em decorrência disto, a produção de algumas substâncias é mantida durante a evolução das espécies com o objetivo de mediar interações ecológicas (NÚÑEZ-PONS; ÁVILA, 2015; BLUNT et al., 2016). Desta forma, a expressão de substâncias bioativas está diretamente ligada à presença de estímulos externos (CHEN et al., 2014). Assim, condições ambientais peculiares aos mares e oceanos, no que tange a acidez ou alcalinidade das águas, pressão, clima, incidência de radiação ultravioleta, natureza e disponibilidade de nutrientes, concentração de oxigênio e salinidade, configuram um importante fator na produção de compostos químicos complexos (CRAGG & NEWMAN, 2013; FELCZYKOWSKA et al., 2012). Além disso, assim como no ambiente terrestre, a mobilidade restrita de alguns organismos marinhos promove mecanismos de defesa baseados

na síntese de metabólitos secundários tóxicos, especialmente terpenóides, alcalóides, esteróides, derivados de açúcares e peptídeos (CHEUNG et al 2015; KUET & EFFERTH, 2014). Sugere-se que os organismos marinhos possuem uma maior prevalência de metabólitos bioativos do que os organismos terrestres (HUSSEIN & MOHAMED, 2015). Ainda, compostos isolados do ambiente marinho são extraordinários por sua complexidade e conectividade, muitas vezes apresentando incorporação de heteroátomos e halogênios (HUSSEIN & MOHAMED, 2015; GRIBBLE, 2015; GERWICK & MOORE, 2012). Assim, processos de adaptação das diversas espécies às pressões ecológicas e ambientais fazem do habitat marinho um reservatório considerável de novos produtos naturais estruturalmente diversos e biologicamente ativos (GERWICK & MOORE, 2012; CRAGG & NEWMAN, 2013; HOU et al., 2015).

Em geral, substâncias naturais isoladas do ambiente marinho expressam maior bioatividade que aquelas do ambiente terrestre. Por exemplo, em ensaios de citotoxicidade, aproximadamente 1% das amostras marinhas testadas evidenciaram potencial antitumoral contra 0,1% das amostras terrestres testadas (LI et al., 2015, MUNRO et al., 1999). No entanto, ao contrário das plantas terrestres, consagradas pelo uso na medicina tradicional, o estudo de organismos marinhos como possível fonte de metabólitos bioativos possui uma história relativamente recente. Esta teve início a pouco mais de 50 anos e tem ganhado um substancial reconhecimento nos últimos anos (HUSSEIN & MOHAMED, 2015). Segundo Blunt e colaboradores (2016) no período de 1965 a 2014, cerca de 25700 novos compostos foram descritos, sendo que o total apenas no último ano deste período foi de 1378 substâncias descritas. Embora apenas cerca de 25 % destas substâncias documentem estudos de bioatividade, muitas já apresentaram potenciais biológicos relevantes (BLUNT et al., 2016; HOU et al., 2015). O surgimento destas novas estruturas químicas, com alta especificidade por receptores moleculares nas células permitiram o desenvolvimento de novas drogas com diversas indicações terapêuticas, especialmente para o tratamento do câncer (RANGEL & FALKENBERG, 2015). Várias formas de vida marinha têm sido submetidas a análises em busca de seus produtos naturais, entre elas tunicados, esponjas, corais moles, lebres do mar, nudibrânquios, briozoários, lesmas do mar e outros organismos (HUSSEIN & MOHAMED, 2015). Como resultado destes estudos, o ambiente marinho tem disponibilizado não só uma variedade de fármacos, mas também agroquímicos, cosméticos, enzimas e suplementos nutricionais, com grandes perspectivas comerciais (MOGHADAMTOUSI et al., 2015; BLUNT et al., 2016; CHEUNG et al 2015; GOGINENI et al., 2015; GRIBBLE, 2015; HONG et al., 2015; HUSSEIN & MOHAMED, 2015; RANGEL & FALKENBERG, 2015).

Os primeiros produtos naturais bioativos reportados que serviram como protótipos para medicamentos foram descobertos na metade do século passado: os nucleosídeos arabinosil espongotimidina e espongouridina, provenientes da esponja marinha caribenha *Tectitethya cripta (Cryptotethya crypta)* (BERGMANN & FEENEY, 1951). Sínteses e modificações das moléculas naturais deram origem às drogas antivirais e antileucêmicas desenvolvidas a partir dos anos 70, incluindo o primeiro tratamento efetivo contra infecção por HIV (RANGEL & FALKENBERG, 2015; GOGINENI et al., 2015). Hoje, transcorridos 65 anos, nove fármacos de origem marinha são utilizados na clínica médica, sob aprovação do FDA (*Food and Drug Administration –* EUA). Além destes, pelo menos 13 fármacos encontram-se em fase de estudos pré-clínicos e clínicos avançados visando diversas aplicações, desde anti-inflamatórios e cicatrizantes, até medicamentos para o tratamento de doenças neurológicas como a doença de Alzheimer e a esquizofrenia (CHEUNG et al 2016; ZHANG et al., 2016; RANGEL & FALKENBERG, 2013; NEWMAN & CRAGG, 2016).

Revisões publicadas por Rangel e Falkenberg (2015) e Mayer e colaboradores (2010) trazem informações detalhadas sobre fármacos marinhos aprovados e os que se encontram atualmente em testes clínicos. De forma geral, o desenvolvimento clínico de fármacos de origem marinha focou-se principalmente no tratamento do câncer, com quatro medicamentos atualmente disponíveis no mercado: 0 nucleosídeo sintético citarabina (arabinofuranosilcitidina ou Ara-C, Cytosar-U[®]) (Quadro 1) indicada para o tratamento das leucemias não-linfocítica aguda, mielocítica crônica e meníngea desde 1972 (MCCONNELL et al., 1994); o mesilato de eribulina (Halaven[®]) (Quadro 1) aprovado em 2010 para o tratamento de câncer de mama metastático, análogo simplificado da halicondrina B, um poliéter macrocíclico produzido por esponjas marinhas (LIU et al., 2012); o alcalóide semisintético trabectedina (Yondelis[®]) (Quadro 1), originalmente produzido pelo tunicado Ecteinascidia turbinata, aprovado em 2007 e utilizado como antitumoral de amplo espectro (GALMARINI et al., 2014); e o brentuximab vedotina (Adcetris[®]) (Quadro 1), que consiste de um derivado sintético da dolastatina 10 conjugado a um anticorpo (DORONINA et al., 2003), lançado no mercado em 2011 para o tratamento de linfomas (RANGEL & FALKENBERG, 2015). Ainda, pelo menos nove substâncias com propriedades antitumorais encontram-se em testes clínicos avançados, como por exemplo, alguns derivados das dolastatinas, originalmente produzidas pelo molusco Dolabella auricularia e cianobactérias (RANGEL & FALKENBERG, 2015). Em destaque, temos o depsipeptídeo deidrodidemnina B (Aplidin[®]) (Quadro 1) isolado do tunicado Aplidium albicans, que se encontra em testes clínicos de fase III para o tratamento de mieloma múltiplo e de fase II para outras neoplasias (MITSIADES et al., 2008). Considerando a eficácia terapêutica do Adcetris[®], outros conjugados de anticorpos e toxinas marinhas também estão sendo avaliados (DORONINA et al., 2008). Produtos naturais marinhos também têm um papel importante no desenvolvimento de medicamentos antivirais. Como exemplo disto, temos o nucleosídeo vidarabina (arabinofuranosiladenina ou Ara-A, Vira-A[®]) (Quadro 1), originado por semi-síntese a partir do nucleosídeo espongouridina e então produzido via fermentativa pelo fungo Streptomyces antibioticus, sendo indicado para o tratamento de infecções virais por herpes, vaccinia e varicella-zoster desde 1976 (WHITLEY et al., 1980). Também inspirado no nucleosídeo original espongouridina, temos os antivirais aciclovir (Zovirax[®]) (Quadro 1), indicado para o tratamento de infecções por herpes simplex, zoster e varicela (SNOECK et al., 1999); e zidovudina (Retrovir[®]), lançado em 1987 para o tratamento de pacientes infectados pelo vírus HIV (MITSUYA et al., 1985). O ziconotídeo (Quadro 1) é um peptídeo analgésico, comercializado pelo nome de Prialt[®], disponível no mercado desde 2004, indicado para o tratamento de dor neuropática e crônica. Ele foi inicialmente isolado do veneno do mexilhão Conus magnus e então sintetizado (MCGIVERN, 2007). O alcalóide tetrodotoxina (Quadro 1), isolado de peixes, algas e bactérias, está atualmente em testes clínicos para o tratamento de dor neuropática e periférica associadas ao câncer (BANE et al., 2014). O tratamento da hipertrigliceridemia também conta com um medicamento representante do ambiente marinho. O mesmo é composto por dois ésteres etílicos do ácido ômega-3 de peixes, comercializados pelo nome de Lovaza®, lançado em 2004 (KOSKI, 2008). Vale ainda citar um produto natural marinho que se destacou na agroindústria: a nereistoxina, extraída da poliqueta marinha Lumbrinereis sp. e que serviu de protótipo para o inseticida Cartap (Padan®) (Quadro 1) largamente utilizado para o controle de pragas em plantações de laranja e outras culturas (FREITAS, 1990).



Quadro 1: Substâncias de origem marinha ou derivadas disponíveis comercialmente ou em ensaios clínicos

Continua Quadro 1:

Atividade Biológica	Estrutura química
<u>Inseticida</u>	H ₂ N S H ₂ N Cartap

Segundo Gerwick e Fenner (2013) há um conceito geral de que, em média, de cada 15000 compostos obtidos de fontes naturais tradicionais que são analisados, apenas um avance para o uso clínico efetivo. Entretanto, considerando o ambiente marinho, a cada cerca de 2500 produtos naturais caracterizados, um tornou-se um fármaco aprovado. Ainda, segundo Hussein e Mohamed (2015), dois dos 13 produtos naturais e derivados aprovados para o uso terapêutico de 2005 a 2007, são provenientes de organismos marinhos. Com base nestes dados, este ambiente peculiar pode ser considerado o maior reservatório de produtos naturais bioativos, com potencial para tratar diversas de doenças (Hussein; Mohamed, 2015). Assim, com o aumento do número de produtos naturais marinhos bioativos caracterizados nos últimos anos, acredita-se que a proporção de medicamentos de origem marinha tende a aumentar num futuro próximo (ZHANG et al., 2016; RANGEL & FALKENBERG, 2015).

1.2 Abordagens modernas da pesquisa com produtos naturais marinhos

O número de produtos naturais marinhos caracterizados tem experimentado um crescimento expressivo a partir dos anos 90 (PÉREZ-VICTORIA et al., 2016; ZHANG et al., 2016). De acordo com Hussein e Mohamed (2015), no período de 2000 a 2003, 2450 novos produtos naturais de origem marinha foram descritos, enquanto que no período de 1965 a 1970, foram apenas 100. Este fato se deve principalmente aos avanços nos métodos científicos modernos, que abrangem desde a coleta e extração dos organismos produtores, aperfeiçoamento de técnicas de desreplicação e elucidação estrutural, síntese química e por fim ensaios biológicos que validam estas substâncias como bioativas (PÉREZ-VICTORIA et al., 2016; ZHANG et al., 2016; RANGEL & FALKENBERG, 2015; LI et al., 2015)

Técnicas e equipamentos sofisticados de amostragem e coleta em ambientes extremos, como as águas profundas de oceanos e solo antártico, tem permitido acesso sem precedentes a uma fonte inexplorada de biodiversidade (LI et al., 2015).

No entanto, estima-se que menos de 0,1% dos microrganismos marinhos são conhecidos e apenas uma pequena quantidade deles são prontamente cultiváveis em laboratório. Assim, técnicas de cultivo incluindo modificações no meio de cultura como o uso de meios baseados em água do mar, adição de substâncias sinalizadoras e outros métodos tem sido empregados para proliferar linhagens de microrganismos com potencial metabólico único (ZHANG et al., 2016).

Para se alcançar com maior eficiência compostos com estruturas inéditas é essencial uma rápida desreplicação (identificação de compostos bioativos já conhecidos) de extratos brutos e suas frações. Para tanto, os principais recursos utilizados são combinações de técnicas validadas de separação de alta resolução (CLAE e CLUE) com sistemas de detecção que fornecem uma alta densidade de informações. Assim, combinações de diferentes instrumentações na forma de dispositivos hifenados como EC-EM (eletroforese capilar-espectrometria de massas), CLAE-EM (cromatografia líquida de alta eficiência-espectrometria de massas) ou CLAE-RMN (cromatografia líquida de alta eficiência-ressonância magnética nuclear) são bastante utilizados nas pesquisas modernas em produtos naturais (PÉREZ-VICTORIA et al., 2016; ZHANG et al., 2016; LI et al., 2015).

O uso de bancos de dados adequados é um fator determinante para a realização de um estudo de desreplicação satisfatório. Para tanto, existem disponíveis inúmeros bancos de dados para produtos naturais, p. ex. *Scifinder, Dictionary of Natural Products, PubChem, ChemSpider, Antibase*, entre outros. Existem ainda alguns bancos de dados específicos de produtos naturais do ambiente marinho como o *Antimarin, Marinlit* e o *Marine Dictionary of Natural Products* (PÉREZ-VICTORIA et al., 2016). O desenvolvimento de banco de dados *in-house* dentro dos centros de pesquisa também é um recurso bastante utilizado para agilizar a descoberta de novos compostos (PÉREZ-VICTORIA et al., 2016). Um exemplo que se destaca é o Molecular Networking, que vem sendo aplicado também no estudo de cianobactérias marinhas e consiste em uma nova abordagem que organiza dados de EM/EM baseado na similaridade química (PÉREZ-VICTORIA et al., 2016; WATROUS et al., 2012; YANG et al., 2013) permitindo não só desreplicar moléculas conhecidas em misturas complexas, mas também indicar correlação com substâncias análogas.

A hifenação de técnicas de separação e detecção fornece informações convenientes dos componentes presentes em uma amostra, porém técnicas de cromatografia analítica e semipreparativa podem ser empregadas para microfracionar o extrato bruto natural com o intuito de obter o isolamento da substância de interesse e assim obter acesso a sua bioatividade e elucidação ativa da sua estrutura (PÉREZ-VICTORIA et al., 2016).

Apesar do tremendo aperfeiçoamento no desempenho das técnicas de espectrometria de massas, a espectroscopia de RMN permanece como mandatória para a elucidação estrutural

absoluta de analitos orgânicos, uma vez que fornece uma maior riqueza de informações estruturais (PÉREZ-VICTORIA et al. 2016; LI et al., 2015). No entanto, a pesquisa de produtos naturais marinhos é limitada pela diminuta quantidade das substâncias purificadas, o que afeta seriamente os dados obtidos por RMN. Para sanar esse problema, além do uso de microtubos que permitem uma menor diluição do analito, existem técnicas de RNM utilizando micro crio-sondas (*microcryoprobes*) que possibilitam a elucidação de estruturas de compostos em escala nanomolecular (LI et al., 2015). Além disso, técnicas computacionais de elucidação estrutural para moléculas com estruturas complexas também tem sido de grande utilidade (LI et al., 2015). A estereoquímica é um importante aspecto da pesquisa de produtos naturais. Recentemente, abordagens integradas para determinação da configuração baseadas em banco de dados de RMN, propriedades opticas, inferências da biossíntese ou bioinformática, cristalografia de raio-X e síntese química tem sido amplamente aplicadas a produtos naturais marinhos (MOLINSKI & MORINAKA, 2012).

Uma importante abordagem da pesquisa em produtos naturais marinhos consiste da fusão de estudos químicos e biológicos por meio do advento da biologia molecular aplicada ao estudo da produção de metabólitos secundários. Esta tem proporcionado grandes avanços no entendimento das bases genéticas e enzimáticas envolvidas na biossíntese de produtos naturais marinhos (LANE & MOORE, 2011; ENGENE et al., 2013a; PEREIRA et al., 2013). Além disso, organismos que crescem em laboratório comumente apresentam grupos de genes silenciados, assim o número de genes biossintéticos real costuma ser muito maior que o número de produtos naturais experimentalmente caracterizados. Atualmente, as abordagens de metagenômica, mineração do genoma e biossíntese heteróloga abriram a janela da prospecção de recursos oceânicos em termos de descoberta de drogas naturais marinhas (ZHANG et al., 2016). Esta abordagem é também um recurso importante que deve ser explorado no estudo da diversidade dos organismos marinhos, sendo uma ferramenta útil para a classificação quimiotaxonômica das espécies (KOMÁREK, 2006; KOMÁREK, 2010).

1.3 Microrganismos marinhos como fonte inestimável de novos produtos naturais bioativos

As águas marinhas comportam uma grande diversidade de formas de vida microbiana, incluindo bactérias, cianobactérias, fungos, vírus e actinomicetos. Estes podem viver de forma livre ou em associação com hospedeiros como animais marinhos e plantas (SINGH et al., 2015).

A maioria das substâncias de origem marinha caracterizadas até o momento foi isolada a partir de organismos superiores como moluscos, esponjas e tunicados, porém há evidências experimentais e circunstanciais que comprovam que microrganismos associados ou simbiontes a estes organismos são ou possam ser os verdadeiros produtores destas substâncias. Neste contexto, alguns autores consideram que bactérias heterotróficas e cianobactérias são as verdadeiras protagonistas metabólicas do mundo oceânico, uma vez que respondem pela biossíntese de cerca de 80% do total de fármacos de origem marinha aprovados e em testes clínicos atualmente (GERWICK & FENNER, 2013; GERWICK & MOORE, 2012; PIEL, 2009).

O potencial de microrganismos marinhos taxonomicamente variados fica bastante claro em revisões publicadas recentemente, que descrevem principalmente as atividades antitumoral, antibacteriana, anti-inflamatória, antifúngica e antiviral de seus metabólitos (BLUNT et al 2016; CHEUNG et al., 2016; CHEUNG et al., 2015; GOGINENI et al., 2015; GRIBBLE, 2015; HABBU et al., 2016; HONG et al., 2015; HOU et al., 2015; MOGHADAMTOUSI et al., 2015; SATO, 2015; SWAIN et al., 2015). Considerando que menos de 0,1% das espécies microbianas do oceano são conhecidas, pode-se notar como uma investigação extensiva de metabólitos secundários marinhos, levando não apenas a um entendimento de seus papéis dentro de seus ecossistemas, mas também do potencial de seu uso na saúde humana, pode abrir muitos caminhos para a descoberta de novos fármacos (HOU et al., 2015; MOGHADAMTOUSI et al., 2015). Assim, pequenos organismos como fungos, cianobactérias e diversos outros grupos de eubactérias, que outrora haviam sido deixados à parte dos estudos para obtenção de produtos bioativos, hoje tem movimentado diversos grupos de pesquisa neste sentido (GERWICK & MOORE, 2012).

1.3.1 Cianobactérias marinhas

Cianobactérias compreendem um filo de organismos pertencentes ao Domínio *Bacteria*, procarióticos, fotossintetizantes, morfologicamente diversos, de crescimento lento, encontrados em uma variedade de habitats e condições ambientais, sendo provavelmente os organismos mais antigos ainda existentes sobre a Terra (DITTMANN et al 2015; MISHRA et al 2015; ALTERMANN & KAZMIERCZAK, 2003). O interesse científico em relação às cianobactérias vem crescendo nos últimos anos, prova disto é que no SciFinder® (ferramenta de busca da CAS® – Chemical Abstracts Service) o número de publicações em que consta o termo "*cyanobacteria*" aumentou mais de 4,5 vezes nos últimos 25 anos (Figura 1). Durante

muito tempo, este interesse esteve ligado principalmente ao estudo das cianotoxinas, que são toxinas produzidas por cianobactérias. Especialmente em condições de eutrofização e elevação da temperatura das águas, as cianobactérias são capazes de formar florações tóxicas, contaminando corpos de água e causando sérias consequências na saúde humana e de outros organismos vivos (DITTMANN et al 2015; FERRÃO-FILHO & SUZUKI, 2011; RATNAYAKE et al., 2012). Ao contrário dos animais, morte por exposição à cianotoxinas é considerada rara em humanos. No entanto, há vários relatos de casos de envenenamento agudo em animais e humanos por cianotoxinas ao redor do mundo (WOOD, 2016). No Brasil, o episódio mais expressivo ocorreu em 1996, devido à exposição intravenosa de pacientes à cianotoxina hepatotóxica microcistina, durante o tratamento em uma clínica de hemodiálise. Este acontecimento culminou em 76 mortes, sendo o primeiro caso de mortes confirmado por cianotoxinas no mundo (WOOD, 2016; AZEVEDO et al., 2002).





Em contrapartida, nos últimos anos, estudos têm revelado que cianobactérias marinhas, terrestres e de água doce são capazes de produzir, somando-se a estas toxinas, uma grande variedade de produtos naturais com estruturas químicas complexas e importantes atividades biológicas. (DITTMANN et al 2015; NUNNERY et al.; 2010; CHLIPALA et al., 2011; DUCAT et al., 2011; COSTA et al., 2012). Dentre as bioatividades descritas para estes metabólitos podemos citar a citotóxica, antitumoral, antiviral, antibacteriana, antiprotozoal, antifúngica, algicida, antiinflamatória, inibidora enzimática, antiobesidade, canabinomimética e protetora contra radiação ultravioleta (BLUNT et al., 2016; DITTMANN et al., 2015; NIEDERMEYER, 2015; RASTOGI et al., 2015; SWAIN et al., 2015; PEREIRA et al., 2010; TAN, 2010; CHOI et al., 2012a; CHOI et al., 2012b; DABAS et al., 2014). Estão entre interessantes descobertas recentes, descritas por Blunt e colaboradores (2016): o lipopeptideo

acetilênico kurahyne (Quadro 2), inibidor de células HeLa e indutor de apoptose, isolado de uma coleção de cianobactérias com predominância de Moorea sp (IWASAKI et al., 2014); 2), análogos de aplysiatoxina (Quadro 3-metoxiaplysiatoxina e 3metoxidebromoaplysiatoxina isolados de Trichodesmium erythraeum, capazes de inibir o vírus Chikungunya (GUPTA et al., 2014); a yoshinona A (Quadro 2), que apresentou potencial como droga anti-obesidade por inibir a diferenciação celular em adipócitos (INUZUKA et al., 2014); E a mooreamida A (Quadro 2), um lipídeo canabinomimético obtido de Moorea bouillonii, o mais potente derivado marinho inibidor do neurorreceptor CB1 descrito até o momento (MEVERS et al., 2014). Estes dados evidenciam parcialmente a gama de diferentes aplicações que podem ser exploradas a partir de metabólitos de cianobactérias.

Quadro 2: Algumas substâncias isoladas recentemente de cianobactérias com atividades biológicas



Presume-se que estes metabólitos foram otimizados por evolução ao longo de bilhões de anos para exercer alta afinidade por seus alvos biológicos em organismos ecologicamente relevantes, assim apresentando atividade também em diferentes contextos biológicos como as células humanas (DITTMANN et al 2015; RASTOGI et al., 2015; SALVADOR-REYES & LUESCH, 2015). Segundo Dittmann e colaboradores (2015), a diversidade química conhecida de produtos naturais de cianobactérias inclui mais de 1100 metabólitos secundários, descritos a partir de 39 gêneros, especialmente Lyngbya, Microcystis, Nostoc e Hapalosiphon. Estas substâncias representam diversas classes estruturais, incluindo peptídeos, policetídeos, alcalóides, lipídeos e terpenos. Muitas vezes apresentando modificações estruturais raras ou incomuns. A maioria são peptídeos, ou contém uma seção peptídica e são produzidas via sistema enzimático peptídeo não ribossomal sintase (NRPS) e/ou via policetídeo sintase (PKS). Assim, algumas substâncias tem predominância peptídica como microcistina, nostoficina, lingbiatoxina, nostopeptolídeo e hectoclorina; enquanto outras possuem predominância policetídica como as jamaicamidas, curacina, cilindrospermopsina e anatoxina-a. Estudos relativos aos mecanismos biossíntéticos, juntamente com avanços no sequenciamento genômico têm demonstrado que a produção de metabólitos secundários de interesse por cianobactérias é fortemente respaldada por um grande arsenal genético e enzimático e muito da diversidade química conhecida é apenas uma fração da verdadeira capacidade biossintética destes organismos (DITTMANN et al 2015; KEHR et al., 2011; JONES et al., 2012, ENGENE et al., 2013a).

O perfil químico de metabólitos secundários de invertebrados marinhos como esponjas, ascídias e moluscos também pode ser alterado por interações ecológicas com cianobactérias, seja por meio de endosimbiose ou por enriquecimento da dieta. Neste sentido, pesquisas indicam que 20% dos produtos naturais marinhos aprovados pelos FDA ou em testes clínicos são possivelmente biossintetizados por cianobactérias (SALVADOR-REYES & LUESCH, 2015; GERWICK & FENNER, 2013). Ainda, a aprovação pelo FDA do conjugado anticorpo-fármaco brentuximab vedotin, inspirado no composto dolastatina 10, derivado de cianobactéria, validou o grupo como fonte de novos fármacos (SALVADOR-REYES & LUESCH, 2015).

Afora o enfoque farmacológico, a engenharia metabólica de cianobactérias também tem sido aplicada com sucesso para a obtenção de produtos biotecnológicos. Desta forma, a capacidade fotossintética das cianobactérias tem sido direcionada para a produção de biocombustíveis, bioplásticos e outras *commodities* químicas (GAO et al., 2016; HEIMANN, 2016; ANGERMAYR et al., 2015).

Assim, estes microrganismos que habitam a Terra à cerca de 2,5 bilhões de anos (RASMUSSEN et al., 2008), demonstram ter um potencial ainda muito longe de ser esgotado, especialmente no que tange a descoberta de novas substâncias para subsidiar a farmacologia moderna. Com base neste argumento e considerando ainda que o litoral brasileiro constitui um ambiente pouco explorado em relação à biodiversidade de cianobactérias, no capítulo I deste trabalho são descritos o isolamento e estudo filogenético de cinco linhagens de cianobactérias marinhas coletadas no litoral do estado de São Paulo e o estudo químico de uma destas linhagens para acesso aos seus constituintes majoritários e as suas possíveis aplicações farmacológicas.

1.3.2 Fungos endofíticos de algas marinhas

A diodiversidade marinha é extremamente complexa e contém um amplo espectro de diversidade de fungos (HONG et al., 2015). O estudo de produtos naturais provenientes de fungos marinhos constitui um campo de pesquisa em ascensão, com 318 novas substâncias reportadas em 2014, comparadas a 223 em 2013 (BLUNT et 2016). Fungos marinhos são potenciais produtores de compostos bioativos com aplicações farmacológicas, dentre elas citotóxica, antiviral, antibacteriana, antifúngica, antioxidante, anti-inflamatória (BLUNT et al., 2016; WIBOWO et al., 2016; ZHANG et al., 2016; MOGHADAMTOUSI et al 2015).

Apesar da patogenicidade de certas espécies de fungos marinhos, a maior parte das relações encontrada em fungos marinhos é do tipo mutualístico. Assim, a vida destes fungos depende fortemente de suas relações simbióticas com outros organismos marinhos como algas e invertebrados (MOGHADAMTOUSI et al 2015). Fungos associados a algas marinhas incluem parasitas, saprófitos ou endosimbiontes, também chamados endofíticos (SINGH et al., 2015). Fungos endofíticos são definidos como aqueles que vivem internamente em hospedeiros (algas ou plantas) aparentemente saudáveis e assintomáticos. Este grupo possui uma alta diversidade de espécies e são considerados ubíquos, sendo que algumas espécies hospedeiras costumam abrigar mais de 30 espécies de fungos diferentes (NISA et al., 2015).

Diversas classes de substâncias químicas como alcalóides, esteroides, xantonas, fenóis, isocumarinas, derivados de perileno, quinonas, furanodionas, terpenóides, flavonoides, depsipeptídeos, citocalasinas, entre outras foram isolados de fungos endofíticos. Estes metabólitos secundários são sintetizados por várias vias, incluindo a via de isoprenóides, policetídeos e/ou a síntese não-ribossomal de peptídeos. Estes, atuando como aloloquímicos, não só promovem proteção ao hospedeiro frente a outros microrganismos circundantes, mas

também garantem sua associação com os hospedeiros (NISA et al., 2015; SINGH et al., 2015).

Hoje, no estudo de produtos naturais, há uma vertente de mudança de enfoque dos organismos hospedeiros para os seus endófitos. Esta mudança pode ser atribuída a dois importantes fatores: Primeiro, o potencial destes organismos de produzirem substâncias químicas novas, importantes para a descoberta de novas drogas (ZHANG et al., 2016); Segundo, a capacidade de produção dos mesmos compostos de seus hospedeiros (NISA et al., 2015). Um exemplo, que decorre deste último fator, é a produção de taxol, inicialmente extraído da casca da planta *Taxus brevifolia*, através de um procedimento inviável ambiental e economicamente. Estudos de aplicação de técnicas biotecnológicas e novos métodos de extração a partir de fungos endofíticos produtores de taxol demonstraram melhorar a eficiência e sustentabilidade da produção deste importante antitumoral (ZHOU et al., 2010). Pesquisas na literatura também revelam que o número de novas estruturas químicas produzidas por endófitos (51%) é significantemente maior que dos fungos do solo (38%) (NISA et al., 2015).

Embora muitos pesquisadores de endófitos e de seus produtos naturais tenham focado naqueles isolados de plantas terrestres, endófitos de macroalgas marinhas tem na última década ganhado atenção como uma fonte inexplorada de biodiversidade e rica em compostos bioativos de estruturas moleculares sem precedentes na natureza (NISA et al., 2015). A gama de espécies de fungos isolados e a descoberta de novos produtos naturais com amplo espectro de atividades, incluindo antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiprotozoário, antiparasítica, antitumoral, antioxidante, moduladora/ inibidora de enzimas, algicida, inseticida, entre outras, dão um vislumbre do potencial biossintético de endófitos de macroalgas (LIU et al., 2016; WANG et al., 2016; ZHANG et al., 2016; FLEWELLING et al., 2015; PRAKASH, 2015; SINGH et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2012; ARIFFIN et al., 2011).

Em suma, fungos endofíticos representam prospectivos produtores de substâncias quimicamente novas e bioativas, para serem exploradas em uma variedade de áreas como medicina, agricultura e indústria. Assim, o capítulo II deste trabalho relata a prospecção químico-farmacológica do fungo *Trichoderma atroviride*, endófito da alga marinha *Bostrychia tenella*, quando em cultivo misto com uma linhagem de cianobactéria. A técnica de cultivo misto será discutida no capítulo II, no entanto, em linhas gerais esta visa forçar a expressão de genes que podem estar silenciados nas condições normais de cultivo laboratorial, levando a uma melhor exploração do potencial biossintético do fungo estudado.

2 CAPÍTULO I – Estudo filogenético e químico de linhagens de cianobactérias do litoral brasileiro

2.1 Introdução

Organismos membros do filo Cyanobacteria apresentam grande diversidade genética e metabólica, característica que se constitui em pré-requisito para serem considerados fonte potencial para a produção de produtos naturais (DITTMANN et al., 2015; ENGENE et al., 2013a). Cianobactérias marinhas provaram ser uma fonte importante de produtos naturais bioativos com diferentes atividades. Dentre elas, existem toxinas perigosas para humanos e animais (DITTMANN et al., 2015; RATNAYAKE et al., 2012; FERRÃO-FILHO & SUZUKI, 2011) e compostos benéficos com atividades antitumoral e antiviral (BLUNT et al., 2016; DITTMANN et al., 2015; GERWICK & MOORE, 2012). A espécie de cianobactéria mais bem conhecida em relação à produção de produtos naturais é a Lyngbya majuscula (ENGENE et al., 2012). Investigações bioquímicas e filogenéticas do gênero Lyngbya demonstraram claramente sua natureza polifilética formada por menos três linhas evolucionárias distintas, resultando na construção de dois novos gêneros de cianobactérias marinhas, Moorea e Okeania, que além de seu parentesco morfológico com Lyngbya, também são ricos na produção de metabólitos secundários bioativos (ENGENE et al. 2012; ENGENE et al. 2013b). Recentemente, outros grupos de cianobactérias marinhas foram avaliados resultando na descrição de um novo gênero, como Halotia e Aliterella (GENUÁRIO et al., 2015; RIGONATO et al., 2016).

A taxonomia moderna baseia-se na abordagem polifásica. Nesta abordagem, são considerados não só aspectos morfológicos, mas também filogenéticos, ultraestruturais, fisiológicos e ecológicos para se obter uma melhor caracterização e classificação taxonômica das linhagens (KOMÁREK, 2010; BRITO et al., 2012; ROLDÁN et al., 2012). Portanto, o estudo da produção de metabólitos secundários também fornece dados importantes para o posicionamento taxonômico de determinada linhagem (KOMÁREK, 2006; KOMÁREK, 2010). Além das avaliações filogenéticas, o isolamento de linhagens de cianobactérias, especialmente em locais pouco explorados, permite a investigação da sua produção de metabólitos bioativos com interesse biomédico ou biotecnológico (SILVA et al., 2014).

Geitlerinema sp é um gênero de cianobactérias filamentosas, homocitadas, pertencente à ordem Oscillatoriales (ANAGNOSTIDIS, 1989). Não há muitos relatos na literatura a respeito de substâncias isoladas a partir deste gênero. Caicedo e colaboradores (2012) relatam

a identificação de dois exometabólitos bioativos, o composto fenólico 4,4'-diidroxibifenil e o alcalóide indólico harmane (Figura 2). Em outros estudos, estes metabólitos apresentaram atividade antimicrobiana, desincrustante e anticianobacteriana (VOLK & FURKERT, 2006; VOLK, 2007; REZA & ABBAS, 2007). Andrianasolo e colaboradores (2005, 2007) isolaram dois produtos naturais com propriedades citotóxicas a partir das células de uma linhagem de cianobactéria marinha *Geitlerinema* sp.: Swinholida A e mitsoamida, um peptídeo linear (Figura 2), previamente isolado em bactérias heterotrófica de esponjas. Além disso, extratos e frações de linhagens de *Geitlerinema* sp apresentaram propriedades antifúngica, antibacteriana e antitumoral (CAICEDO et al., 2011; SRIVASTAVA et al., 2015), evidenciando o potencial farmacológico do gênero.





A descoberta dos nucleosideos espongosina, espongotimidina e espongouridina (Figura 3) a partir da esponja caribenha *Cryptotethia crypta* deu início à história dos produtos naturais marinhos nos anos 50 (BERGMANN & FEENEY, 1951; BERGMANN & FEENEY, 1950; BERGMANN & BURKE, 1955). Desde então, vários organismos revelaram habilidade para produzir nucleosídeos com estrutura não usual e bioatividades significantes (HUANG et al. 2014). Espongotimidina e espongouridina são arabinosil glicosídeos que apresentaram

atividade biológica (GOGINENI et al., 2015). Uma vez sabendo-se que os sistemas biológicos poderiam reconhecer nucleosídeos com açúcares modificados ou acíclicos, vários análogos nucleosídeos foram sintetizados, dando origem a drogas com ação antitumoral e antiviral como a citarabina (ara-C), a vidarabina (ara-A) e a zidovudina (Figura 3), o principal antirretroviral usado para suprimir a viremia em pacientes HIV positivos (RANGEL & FALKENBERG, 2015).



Figura 3: Nucleosídeos marinhos e derivados sintéticos utilizados na clínica

Estudos relacionados ao isolamento de nucleosídeos de cianobactérias são ainda escassos na literatura. Considerando que linhagens de cianobactérias marinhas tropicais bentônicas tem um grande interesse devido a sua produção de metabólitos secundários bioativos, levantou-se a hipótese de que a pesquisa por produtores prolíficos de produtos naturais e sua caracterização representa um ponto de partida para a descoberta de drogas. Este capítulo não só provê dados para a caracterização morfológica, molecular e química de
linhagens desconhecidas do litoral brasileiro, mas também identifica uma nova fonte de nucleosídeos.

2.2 Objetivos

O objetivo geral do trabalho foi realizar um estudo químico em busca de substâncias com potencial farmacológico em linhagens de cianobactérias marinhas coletadas na região de Ubatuba, Estado de São Paulo (Brasil). Tendo em vista este propósito, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

- Isolar e realizar a caracterização morfológica e molecular das linhagens de cianobactérias marinhas coletadas na região de Ubatuba – SP – Brasil;
- Avaliar e definir o meio de cultura mais favorável à obtenção de biomassa das culturas de cianobactérias em escala ampliada;
- Realizar triagem química preliminar (CLAE-DAD, CG-EM) das frações polar e apolar dos extratos obtidos a partir das culturas das cianobactérias;
- Proceder ao isolamento e à elucidação estrutural dos constituintes majoritários dos extratos da(s) espécie(s) de cianobactéria(s) mais promissora(s).

2.3 Material e Métodos

2.3.1 Procedimentos gerais

2.3.1.1 Equipamentos e softwares:

A instrumentação analítica utilizada foi: Balança semi-analítica (modelo FA-2204CI-BI, Bioscale, São Paulo, Brasil); Espectrômetros de RMN (modelos DRX 400 e DRX 500, Bruker, Billerica, MA, EUA) (Departamento de Química, Faculdade de Ciências, Filosofia e Letras de Ribeirão Preto – USP); Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (modelo LC-6AD, Shimadzu, Kyoto, Japão) com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) (modelo SPD-M10A, Shimadzu) (Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – NPPNS/FCFRP/USP); Cromatógrafo Líquido (Modelo Alliance 2695, Waters, Milford, MA, EUA) acoplado à Espectrômetro de Massas (Modelo ZQ 2000, Waters) com ionizador eletrospray e analizador quadrupolo (NPPNS/FCFRP/USP); Cromatógrafo gasoso (modelo QP 2010, Shimadzu) acoplado à Espectrômetro de Massas com ionizador por elétrons (70 eV) com injetor split (250 °C) NPPNS/FCFRP/USP); Polarímetro (modelo P- 300, Jasco, Japão); Ponto de Fusão (modelo 431, Fisatom, São Paulo, Brasil).

Equipamentos de uso geral: Capela de fluxo laminar (Pachane, Piracicaba, SP, Brasil); Sistema ultrapurificador de água Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA); Autoclave vertical (Phoenix, Araraquara, SP, Brasil); Evaporador rotativo (Buchi, modelo R-210); Centrífuga; Bomba a vácuo; E lavadora ultrassônica.

Softwares utilizados: Shimadzu Class VP HPLC software; Waters MassLynx LC-MS software; Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) software; Portable MestReNova 6.0.2 (Mestrelab Research); E ChemBioDraw Ultra (Perkin Elmer).

2.3.1.2 Materiais diversos, solventes e meios de cultura:

Coluna analítica C8 (250 x 4,6mm - ShimadzuShim-pack); Coluna semi-preparativa C8 (250 x 20mm, Shimadzu Shim-pack), Coluna CG: DB-5Ms (30m, 0,25mm, 0,25µm, Agilent); Solventes de grau HPLC: Acetonitrila (JT Baker); Solvente deuterado: CD₃OD (Sigma-Aldrich); Solventes de grau analítico: metanol, acetato de etila, n-hexano, diclorometano.

Os meios de cultura utilizados para a manutenção e crescimento das linhagens de cianobactérias foram preparados de acordo com o descrito no site do *Institute Pasteur* (http://www.pasteur.fr): água marinha natural (SW), SWBG-11, MN (CASTENHOLZ, 1988) e ASNIII (RIPPKA et al., 1979) suplementado com vitamina B₁₂. A composição dos meios artificiais está descrita no Quadro 3. O pH final é de 7,4 (SWBG₁₁), 7,5 (ASN III + Vit. B12) e 8,3 (MN).

	Concentração final no meio (g/ L)			
	SWBG ₁₁	ASN III + Vit. B ₁₂	MN	
NaCl	12,5	12,5	-	
MgCl ₂ .6H ₂ O	1,0	1,0	-	
KCl	0,25	0,25	-	
NaNO ₃	1,5	0,75	0,75	
K ₂ HPO ₄	0,04	0,02	0,02	
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,075	3,5	0,038	
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,036	0,5	0,018	
Ácido Cítrico	0,006	0,003	0,003	
Citrato de Amônio Férrico	0,006	0,003	0,003	
Na ₂ EDTA	0,001	0,0005	0,0005	
Carbonato de sódio	0,02	0,02	0,02	
Solução de	1 mL*	1 mL*	1 mL*	
micronutrientes ¹				
Vitamina B ₁₂	-	0,01 mg*	-	
Água marinha natural	-	-	750 mL*	

Quadro 3: Meios de cultura utilizados para o cultivo das linhagens isoladas de cianobactérias.

* Valor absoluto adicionado à cada 1 litro de meio de cultura preparado. ¹ A solução de micronutrientes compreende uma mistura de H₃BO₃ (2,86 g/ L), MnCl₂.4H₂O (1,81 g/ L), ZnSO₄.7H₂O (0,222 g/ L), Na₂Mo₄.2H₂O (0,39 g/ L), CuSO₄.5H₂O (0,079 g/ L), Co(NO₃)₂.6H₂O (0,049 g/ L).

2.3.2 Coleta, isolamento e caracterização morfológica e filogenética das linhagens de cianobactérias

Amostras ambientais de material perifítico contendo cianobactérias foram coletadas na região de Ubatuba, Praia da Fortaleza (23° 31' 53,88"S; 45° 9' 51.63" O), litoral norte do estado de São Paulo (Brasil) (Figura 4), em setembro de 2011. As amostras ambientais foram transferidas para meio SWBG-11 e transportadas ao Laboratório de Química Orgânica do

Ambiente Marinho - NPPNS (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto -Universidade de São Paulo, FCFRP/USP), onde se encontram mantidas em cultivo. Amostras também foram enviadas ao Laboratório de Ecologia Molecular de Cianobactérias (Centro de Energia Nuclear na Agricultura, CENA/USP), para isolamento, identificação morfológica e molecular, com a colaboração da Profa. Dra. Marli Fátima Fiore, onde as linhagens isoladas são mantidas, por meio de repicagens periódicas em meios de cultura líquidos SWBG₁₁, MN e MN₀ (CASTENHOLZ, 1988).

Figura 4: Local de realização da coleta do material perifítico contendo cianobactérias. O circulo preto indica a Praia da Fortaleza (23° 31' 53.88"S; 45° 9' 51.63" O), município de Ubatuba, litoral norte do estado de São Paulo, Brasil.



Para o isolamento das linhagens de cianobactérias, o material coletado foi fracionado mecanicamente e as secções foram inoculadas em três diferentes meios de cultura, específicos para cianobactérias de origem marinha ASN-III (RIPPKA et al., 1979), SWBG-11 e MN (CASTENHOLZ, 1988) adicionado com ciclohexamida (70 mg·L⁻¹) e mantidos em câmara de crescimento com temperatura de 25 ± 1 °C, sob iluminação fluorescente em fotoperíodos de 14 h claro: 10 h escuro e irradiância 30-40 µmol.fóton.m⁻².s⁻¹. Repicagens e estriamentos sucessivos foram realizados em placas de Petri em meio sólido (1.2 % de ágar p/v) com uma alça de platina até o estabelecimento da condição monoespecífica das linhagens de cianobactérias (condição unicianobacterial), observada por microscópio óptico. As condições de iluminação e temperatura foram controladas durante todos os passos de isolamento.

Após o isolamento, a identificação taxonômica foi realizada utilizando os caracteres morfológicos diacríticos para os gêneros, seguindo a chave de classificação descrita por Komárek e Anagnostidis (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS, 1989; KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS, 1999; KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS, 2005), levando em consideração o sistema de classificação proposto por Hoffmann (HOFFMANN ET AL., 2005). A literatura atual com descrição de novos *taxa* também foi consultada. A inspeção microscópica foi conduzida em um microscópico óptico Zeiss Axioskop 40 equipado com um sistema de imagem digital AxioVision LE 4.6 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha).

De forma resumida, a caracterização molecular foi realizada nas seguintes etapas: Extração de DNA, seguindo método adaptado para cianobactérias (FIORE et al., 2000); Amplificação do gene que codifica para o RNAr 16S por PCR; Clonagem; Transformação; PCR usando colônias; Extração do DNA plasmidial; E sequenciamento (ANDREOTE et al., 2014; GENUÁRIO et al., 2013; FIORE et al., 2007). Para o processamento e análise filogenética das sequências, estas foram comparadas com sequências previamente depositadas no *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), usando a ferramenta *Basic Local Aligment Search Tool* (BLAST) (ALTSCHUL et al., 1990). Para a construção da árvore filogenética, pelo método de máxima verossimilhança (*Maximum Likelihood*), as sequências obtidas e outras selecionadas em bancos de dados públicos, foram alinhadas e editadas usando o pacote de programa MEGA 5.0 (TAMURA et al., 2011).

Assim, foram obtidas cinco linhagens distintas, codificadas como: CENA552, CENA553, CENA554, CENA555 e CENA556.

2.3.3 Avaliação e seleção do meio de cultura para as linhagens de cianobactérias e manutenção das culturas

Visando a obtenção de maior biomassa das linhagens isoladas de cianobactérias, foi realizado um experimento testando diferentes meios de cultura. Foram testados 4 meios de cultura para cada uma das 5 linhagens de cianobactérias isoladas. Os meios de cultura avaliados foram: água marinha natural (SW), MN, SWBG₁₁ e ASN III suplementado com vitamina B12 (ASNIII+B12), conforme descritos no site do *Institut Pasteur* (*http://www.pasteur.fr*). Transferiu-se um inóculo inicial de cada linhagem com volume de 1mL (cerca de 20 mg em peso seco), em duplicata, para frascos tipo Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de cada meio de cultura. Os frascos de cultivo foram mantidos sob iluminação fluorescente, com agitação ocasional e temperatura de 24 \pm 1 °C. Ao final de 28 dias, a biomassa de cada frasco de cultivo foi filtrada sob pressão reduzida, lavada com água ultrapurificada e seca em dessecador, sob pressão reduzida à temperatura ambiente até peso constante. O cálculo do acréscimo de biomassa foi feito diminuindo-se o peso inicial do peso

final da amostra (SANT'ANNA et al, 2006). Para a análise dos resultados e escolha do meio de cultura que favorecesse maior acúmulo de biomassa para as linhagens em estudo, foram aplicados os testes de ANOVA e Teste de Tukey.

2.3.4 Cultivo em escala ampliada das linhagens de cianobactéria CENA552 e CENA556, extração e análise do perfil químico por CLAE-DAD e CG-EM

Para a produção de biomassa visando às análises químicas, as linhagens isoladas foram mantidas em cultura no Laboratório de Química Orgânica do Ambiente Marinho (divisão de cultivo) - NPPNS (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, FCFRP/USP). A linhagem de cianobactéria CENA552 foi cultivada em meio SWBG₁₁ e a linhagem CENA556 em meio ASNIII+B12. O meio de cultura foi trocado a cada 30 dias e as culturas periodicamente repicadas em frascos tipo Erlenmeyer, gradativamente maiores. A manutenção se fez em condições assépticas, sob iluminação fluorescente em fotoperíodos de 14 h claro:10 h escuro e temperatura de 24 ± 1 °C.

A biomassa de cada linhagem cultivada por 180 dias foi filtrada sob pressão reduzida em papel de filtro e seca em temperatura ambiente. A mesma foi extraída por duas vezes consecutivas com 500 mL de uma mistura de diclorometano/ metanol (2:1) e uma vez com 500 mL de acetato de etila 100%. Estes extratos foram combinados e em seguida filtrados em papel de filtro e concentrados em evaporador rotativo dando origem aos extratos CENA552_SWBG-11, com rendimento de 10,48 g e CENA556_ASNIII, com rendimento de 13,43 g. Os extratos foram submetidos a uma partição líquido-líquido, utilizando 100 mL de uma mistura de metanol/ água (95:5) a qual foi extraída por 3 vezes com 50 ml de hexano. Desta forma gerou-se uma fração hexânica com rendimento de 6,58 g e 10,13 g e uma fração metanol/ água (95:5) com rendimento de 3,18 g e 3,27 g, para as linhagens CENA552 e CENA556, respectivamente. O perfil químico das frações metanol/ água de ambos os extratos foi determinado por CLAE-DAD, utilizando uma coluna analítica C8, a temperatura ambiente, seguindo o gradiente exploratório de acetonitrila em água: $0 \min - 2\%$ CH₃CN; 40 min - 100% CH₃CN; 50 min - 100% CH₃CN; 55min - 2% CH₃CN; e 60 min - 2% CH₃CN, com fluxo de 1 mL/ min. As frações hexânicas foram analisadas por CG-EM. Assim, os padrões de fragmentação, bem como o índice de retenção de Kovats (IK) calculado, foram utilizados para caracterizar e identificar as substâncias majoritárias presentes.

2.3.5 Isolamento e elucidação estrutural das substâncias majoritárias da fração polar do extrato CENA556_ASNIII

A fração metanol/ água (95: 5) do extrato da linhagem CENA556 foi selecionada para isolamento de seus constituintes químicos majoritários. Esta foi submetida à CLAE em coluna semipreparativa C8, utilizando uma fase móvel gradiente de 2 a 8% de acetonitrila em água, durante 45 minutos, com fluxo de 10 mL/ minuto e volume de injeção de 1 mL de amostra na concentração de 200 mg/ mL. As substâncias isoladas foram caracterizadas por experimentos de RMN uni (¹H) e bidimensionais (COSY¹H¹H, HSQC e HMBC) usando CD₃OD como solvente. Além disso, foram obtidos espectros de massas de alta resolução (ESI-TOF), por infusão direta. O fluxograma desta etapa está representado na Figura 5.

Figura 5: Fluxograma do isolamento e/ou identificação dos metabólitos produzidos pela linhagem de cianobactéria CENA556.



2.4 Resultados e discussão

2.4.1 Caracterização morfológica e filogenética das linhagens de cianobactérias

Cinco linhagens cianobacterianas foram isoladas do perifíton coletado a beira mar junto às rochas da Praia da Fortaleza, município de Ubatuba, estado de São Paulo, Brasil. De acordo com a análise morfológica, esses morfotipos pertencem à ordem Pseudanabaenales, família Pseudanabaenaceae e aos gêneros *Geitlerinema* (CENA552 e CENA556) e *Leptolyngbya* (CENA553, CENA554 e CENA555) (Figura 6).

Estudos baseados na observação microscópica de amostras naturais da costa atlântica brasileira descrevem apenas a presença de morfotipos *Leptolyngbya* (BRANCO et al., 2003; NOGUEIRA et al., 2001; BRANCO et al., 1997). Da mesma forma, linhagens de *Leptolyngbya* marinhas foram isoladas do solo e do perofíton de amostras coletadas em mangues brasileiros (SILVA et al., 2014). No entanto, este é o primeiro estudo mostrando a ocorrência de morfotipos *Geitlerinema* marinhos no Brasil.

Sequencias completas dos genes RNAr 16S (1411/1412 pares de bases) foram obtidas para todas as novas linhagens de cianobactérias. Análises de BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) mostraram identidades variando de 99,7 a 93,3% para cianobactérias cultivadas dos gêneros *Geitlerinema, Oscillatoria* e *Leptolyngbya*. Incuindo-se bactérias e cianobactérias não cultivadas esses valores variaram de 99,7% a 95,7% (Tabela 4 – Anexo I).

Figura 6: Fotomicrografias de cianobactérias isoladas do perifíton no litoral brasileiro. **A** e **H:** *Leptolyngbya* sp. CENA553; **B** e **E:** *Geitlerinema* sp. CENA556; **C** e **I:** *Leptolyngbya* sp. CENA555; **D** e **G:** *Geitlerinema* sp. CENA552; **F:** *Leptolyngbya* sp. CENA554.



Árvores filogenéticas baseadas na sequência dos genes RNAr 16S foram construídas considerando sequências de morfotipos filamentosos não heterocitados (Figura 23 – Anexo II). De acordo com a árvore filogenética, as novas sequências encaixam-se em dois diferentes grupos. Duas novas sequencias, recuperadas de CENA552 e CENA556, foram agrupadas externamente ao grupo contendo sequencias de bactérias não cultivadas e *Geitlerinema* com 95% de valor de reamostragem (*bootstrap*) (C-I). As demais sequências obtidas de CENA553,

CENA554 e CENA555 foram associadas com cianobactérias não cultivadas, Geitlerinema e Halomicronema sem suporte bootstrap (C-II). Apesar destas novas linhagens terem sido indentificadas morfologicamente como Geitlerinema e Leptolyngbya, suas sequencias RNAr 16S não permitiram seu agrupamento com as espécies destes gêneros considerando o International Code of Nomenclature for Algae, Fungi, and Plants (ICN) (MCNIELL et al., 2012). De forma semelhante, as novas sequências foram agrupadas à parte dos gêneros Nodosilinea (PERKERSON et al., 2011), Alkalinema (VAZ et al., 2015), Pantanalinema (VAZ et al., 2015), Oculatella (ZAMMIT et al., 2012) e Plectolyngbya (TATON et al., 2011) que emergiram de linhagens genéticas distintas de morfotipos semelhantes a Leptolynbya. Ainda, estas novas sequências não exibem qualquer relação com sequências de Leptolyngbya recuperadas dos mangues brasileiros. Pelo contrário, as novas sequências RNAr 16S foram associadas às sequencias de referência Geitlerinema de ambiente marinho (PCC 7105) e de água doce (PCC 7407) em grupos C-I e C-II, respectivamente, de acordo com o Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (CASTENHOLZ et al., 2001). As novas sequências de Leptolyngbya agruparam com sequências de Geitlerinema de água doce no grupo C-II sem suporte bootstrap. Morfolgicamente, representantes deste gênero se diferem de Leptolyngbya por sua mobilidade de deslizamento muito ativa e ausência de bainha mucilaginosa (CASTENHOLZ et al., 2001). Portanto, este parentesco filogenético virtual pode ser um artefato da ausência de sequências de RNAr 16S com identidade genética maior como demonstrado por sua fraca associação na reconstrução filogenética e sua baixa identidade.

Baseado na divergência genética de sequências RNAr 16S entre aquelas usadas na árvore filogenética, estas novas linhagens cianobacterianas podem representar duas novas unidades genéricas. Da mesma forma que se observa variabilidade genética em relação às suas sequências 16S, espera que se observe variabilidade também no conteúdo genômico, que por sua vez pode conduzir alterações no perfil metabólico, culminando com a produção de produtos naturais ainda não descobertos.

Nos últimos anos, Engene e colaboradores investigaram a filogenia usando sequências do gene RNAr 16S de morfotipos marinhos tropicais que se assemelham ao gênero *Lyngbya* evidenciando sua condição polifilética. Consequentemente, eles descreveram os gêneros *Moorea* e *Okeania* abrangendo espécies capazes de produzir metabólitos secundários únicos e estruturalmente diversos (ENGENE et al. 2010; ENGENE et al. 2012; ENGENE et al. 2013b). Da mesma forma, eles realizaram uma revisão da cianobactéria marinha *Phormidium penicillatum (Symploca hydnoides)* resultando na descrição do gênero *Caldora* (ENGENE et al. 2015). Estes autores demonstraram que a produção de dolastatina 10 e ou o composto

relacionado symplostatin 1 é uma característica comum entre espécies de *C. penicillata* útil como marcador quimiotaxonômico (ENGENE et al. 2015). Myers e colaboradores (2007) examinando a diversidade de cianobactérias presentes na doença da faixa preta de corais (BBD) isolaram morfotipos de *Geitlerinema* e *Leptolyngbya* e detectaram as suas sequências RNAr 16S no perfil DGGE (*Denaturing gradient gel electrophoresis*) de corais coletados de regiões amplamente separadas. Este último estudo, especulou que a produção da toxina mediada por estes morfotipos de cianobactérias marinhas pode estar relacionada à BBD em corais. Ainda, a produção de exometabólitos bioativos foi descrita para a linhagem marinha *Geitlerinema* sp. So-11 (CAICEDO et al. 2012). Adicionalmente, a produção de toxinas solúveis em água foi confirmada para espécies de água doce *Geitlerinema splendidum* CCIBt 3223 conduzida em um estudo toxicológico e histopatológico (RANGEL et al. 2014). Estes estudos indicaram o potencial de diferentes morfotipos *Geitlerinema* de produzir uma ampla variedade de substâncias com diferentes ações.

2.4.2 Avaliação e seleção do meio de cultura para as linhagens de cianobactérias

O isolamento e a identificação de metabólitos secundários de cianobactérias pode ser um fator limitante para o estudo destes organismos. O manejo de cianobactérias para a produção de biomassa requer meios de cultura enriquecidos com uma grande variedade de nutrientes e de um controle de temperatura e iluminação adequado. Além disso, são requeridas trocas frequentes do meio de cultura, com ampliação gradativa da escala de cultivo, evitando assim, a depleção de nutrientes e o fenômeno de fotoxidação. Portanto, cultivar cianobactérias em laboratório é um processo que demanda tempo considerável. Para otimizar este fator, foi feito inicialmente um teste para verificar o meio de cultura mais apropriado para ganho de biomassa para cada linhagem isolada.

A água marinha natural (SW), que era inicialmente utilizada para manutenção das amostras ambientais, não se mostrou satisfatória para o crescimento das linhagens. Por meio do cálculo de aumento da biomassa foi verificado que os meios MN e SWBG11 favoreciam indistintamente a produção da biomassa nas linhagens CENA552, CENA553 e CENA555. Nenhum dos meios estudados apresentou diferença significativa para o ganho de biomassa da linhagem CENA554. Para a linhagem CENA556, os meios que se mostraram mais favoráveis para o ganho de biomassa foram o MN e o ASNIII, sendo que não apresentaram diferença significativa entre eles. Para todos os cálculos considerou-se p < 0,05. Estes resultados são mostrados na Figura 7. Os meios SWBG11 e ASNIII são mais facilmente padronizáveis, pois utilizam sais e substâncias disponíveis comercialmente. Portanto os meios de escolha para o cultivo das linhagens foram: meio SWBG11 para as linhagens CENA552, CENA553, CENA554 e CENA555 e meio ASNIII para a linhagem CENA556.

Figura 7: Ganho de biomassa, expressos em mg, das linhagem CENA552, CENA553, CENA554, CENA555 e CENA556, para cada meio de cultura testados, em 28 dias de cultivo no Laboratório de Química Orgânica do Ambiente Marinho (divisão de cultivo) - NPPNS (FCFRP/USP).



2.4.3 Avaliação do perfil químico das frações polar e apolar dos extratos das linhagens CENA552 e CENA556 por CLAE-DAD e CG-EM

Na análise das frações MeOH: água (95:5) dos extratos das duas linhagens de cianobactérias por CLAE-DAD em condições exploratórias observou-se a presença de

substâncias majoritárias de natureza polar, no início do cromatograma. Para a linhagem CENA552, o cromatograma obtido demonstrou substâncias com máximos de absorção de luz UV em torno de 220 nm e 280 nm e tempos de retenção entre 5 e 10 minutos (Figura 8). Para a linhagem CENA556 observou-se uma série de picos com absorção de luz UV com máximos em torno de 260 nm e com tempos de retenção entre 5 e 11 minutos (Figura 9). Assim, o método analítico foi otimizado visando obter uma melhor resolução dos picos e então o mesmo foi transposto para escala semi-preparativa e os picos foram coletados.

Figura 8: Cromatograma da fração metanol/ água (95:5) do extrato da linhagem *Geitlerinema* sp CENA 552 em CLAE-DAD a 253 nm. Coluna analítica C8, Fase móvel: acetonitrila em água: 0 min – 2% CH₃CN; 40 min – 100% CH₃CN; 50 min – 100% CH₃CN; 55min – 2% CH₃CN; e 60 min – 2% CH₃CN, com fluxo de 1 mL/ min.



Figura 9: Cromatograma da fração metanol/ água (95:5) do extrato da linhagem *Geitlerinema* sp CENA 556 em CLAE-DAD a 253 nm. Coluna analítica C8, Fase móvel: acetonitrila em água: 0 min – 2% CH₃CN; 40 min – 100% CH₃CN; 50 min – 100% CH₃CN; 55min – 2% CH₃CN; e 60 min – 2% CH₃CN, com fluxo de 1 mL/ min.



Para identificação das substâncias presentes nas frações hexânicas dos extratos das linhagens CENA552 e CENA556 por CG-EM, considerou-se apenas picos com porcentagem de área ≥ 2 %, que apresentaram índice de similaridade (IS) superior a 90% e que obtiveram um índice de retenção próximo ao descrito na literatura. Assim, foi possível sugerir a presença de substâncias, tais como: 2-hexil,1-decanol, 3-octadeceno, neofitadieno, palmitato de metila, fitol e *Cis*-3-octiloxiraneoctanoate de metila, para a linhagem CENA552; E dodecanal, 8-heptadeceno, pentadecano, octadecano, palmitaldeído, neofitadieno, palmitoleato de metila, palmitato de metila, ácido linoleico, linoleato de metila, 9-hexadecenoato de etila e fitol para a linhagem CENA556 (Tabela 1). Para o extrato da linhagem *Geitlerinema* sp CENA552, a substância mais abundante na fração apolar foi 2-hexil,1-decanol, um álcool primário. Já a fração apolar do extrato da linhagem *Geitlerinema* sp CENA556 apresentou como componentes principais os hidrocarbonetos pentadecano e octadecano. Assim, estas linhagens de cianobactérias podem ser consideradas promissoras como ponto de partida para exploração biotecnológica visando fins industriais.

Flutuações de preço e consequências ambientais causadas por combustíveis fósseis e petroquímicos vêm sendo uma pauta preocupante nos últimos anos. A capacidade biossintética das cianobactérias, que utilizam luz solar e CO₂ como fontes de energia e carbono, tem chamado atenção de diversos grupos de pesquisa no sentido de obtenção de químicos e biocombustíveis verdes, especialmente por meio da engenharia metabólica (GAO et al., 2016; HEIMANN et al., 2016; ANGERMAYR et al., 2015). Novos combustíveis com melhor conteúdo de energia, volatilidade, não corrosividade e compatibilidade, como butanol e alcanos foram produzidos via fermentativa por bactérias anaeróbicas como *Clostridium acetobutylicum* na década passada, no entanto, estes microrganismos requerem uma ampla demanda metabólica, tornado o processo desvantajoso economicamente (GAO et al., 2016).

Os diterpenos naftadieno e fitol foram identificados nas duas linhagens de cianobactérias, sendo o naftadieno uma das substâncias majoritárias para *Geitlerinema* sp CENA556. Estas substâncias também foram encontradas em cianobactérias de outra espécies, macroalgas marinhas, microalgas e plantas. Sugere-se em diversos estudos que estes componentes possuam atividade antimicrobiana e antiviral (SANTOS et al., 2015; TRONCOSO et al., 2015; SANTOYO et al., 2012; JEYADEVI et al., 2013; AL-WATHNANI et al., 2012).

Fração hexânica CENA552								
Pico	Tr (min)	% de	Substância correlata	IS	IK	IK		
	10.025	área		0.60/	esperado	calculado		
1	12,835	15,72		96%	1790	1702		
2	14,019	2,48	3-octadeceno	96%	1819	1807		
3	14,346	7,48	Neofitadieno	95%	1836	1838		
4	15,223	4,31	Palmitato de metila	97%	1925	1925		
5	17,671	3,35	Fitol	96%	2045	1825		
6	21,249	2,80	Cis-3-octiloxiraneoctanoate de metila	93%	2129	1909		
			^\ Î					
			Fração hexânica CENA556					
Pico	Tr (min)	% de	Substância correlata	IS	IK	IK		
		área			esperado	calculado		
1	9,197	2,77	Dodecanal	97	1410	1409		
2	12,591	3,21	8-heptadeceno	96	1719	1678		
3	12,842	24,54	Pentadecano	98	1512	1700		
			Octadecano					
				98	1810			
4	13,660	3,79	Palmitaldeído	91	1800	1774		
5	14.351	21.17	Neofitadieno	95	1836	1839		
	y	7 -						
6	14,960	2,21	Palmitoleato de metila	96	1886	1897		
	15.000	0.01		07	1005	1001		
7	15,220	2,01	Palmitato de metila	97	1925	1921		

Tabela 1: Substâncias identificadas na fração hexânica dos extratos das linhagens CENA552 e CENA556.



Legenda: Tr: Tempo de retenção; IS: índice de similaridade; IK: índice de Kovats.

2.4.4 Isolamento e elucidação estrutural das substâncias majoritárias da fração polar do extrato CENA556_ASNIII

Cinco nucleosídeos e dois aminoácidos conhecidos foram isolados da fração polar (MeOH/ H2O 95:5) do extrato orgânico da linhagem de cianobactéria *Geitlerinema* CENA556. Os nucleosídeos foram identificados como: uridina (Figura 10-1), 2'-deoxiuridina (Figura 10-2), timidina (Figura 10-3), adenosina (Figura 10-4), and 2'-deoxiadenosina (Figura 10-5). Os aminoácidos foram identificados como D-leucina (Figura 10-6) e L-fenilalanina (Figura 10-7).

Figura 10: Nucleosídeos e aminoácidos isolados da linhagem de cianobactéria *Geitlerinema* sp. CENA556.



A caracterização e os dados espectroscópicos destas substâncias são mostrados a seguir. Os dados de deslocamento químico de ¹³C foram obtidos por meio das análises de RMN bidimensional (HSQC e HMBC):

Uridina (1) Sólido branco (13 mg); Ponto de fusão: 164-166 °C (ISHIKAWA et al., 2003); UV_{máx}: 260 nm (SGARRELLA et al., 2007); m/z 267,0600 [M + Na]⁺ e 243,0616 [M – H]⁻ (DUAN et al., 2011; LIU et al., 2008) (Figura 23 - Anexo III e Figura 24 - Anexo IV). Fórmula molecular: C₉H₁₂N₂O₆ (erro: + 4,1 ppm); RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) (Figura 25 -Anexo V e Figura 26 – Anexo VI): $\delta_{\rm H}$ 5,70 (d, *J*= 8,0 Hz, H-3), 8,02 (d, *J*= 8,0 Hz, H-4), 5,90 (d, *J*= 4,6 Hz, H-1'), 4,17 (t, *J*= 4,6 Hz, H-2'), 4,14 (t, *J*= 4,6 Hz, H-3'), 4,00 (m, H-4'), 3,73 (dd, J= 12,2, 2,9 Hz, H-5'a), 3,83 (dd, J= 12,2, 2,6 Hz, H-5'b); RMN ¹³C (HSQC e HMBC, 500 MH_Z, CD₃OD) (Figura 27 - Anexo VII e Figura 28 - Anexo VIII): δ_{C} 166,1 (C, C-2), 102,4 (CH, C-3), 142,2 (CH, C-4), 152,3 (C, C-6), 90,3 (CH, C-1'), 75,4 (CH, C-2'), 70,7 (CH, C-3'), 86,0 (CH, C-4'), 61,9 (CH₂, C-5') (LI et al., 2004, YALÇIN et al., 2003).

2'-deoxiuridina (2) Sólido branco (14 mg); Ponto de fusão: 163-166 °C (LI et al. 2004); UV_{máx}: 260 nm (SGARRELLA et al., 2007); *m/z* 251.0660 [M + Na]⁺ e 227.0616 [M - H]⁻ (ABOU-HUSSEIN et al., 2007) (Figura 29 - Anexo IX e Figura 30 - Anexo X). Fórmula molecular: C₉H₁₂N₂O₅ (erro: + 8,3 ppm); RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) (Figura 31 - Anexo XI e Figura 32 - Anexo XII): $\delta_{\rm H}$ 5,69 (d, *J*= 8,0 Hz, H-3), 7,99 (d, *J*= 8,0 Hz, H-4), 6,27 (t, *J*= 6,6 Hz, H-1'), 2,20 (m, H-2'a) 2,28 (m, H-2'b), 4,38 (m, H-3'), 3,92 (m, H-4'), 3,70 (dd, *J*= 12,0, 3,6 Hz, H-5'a), 3,77 (dd, *J*= 12,0, 3,2 Hz, H-5'b); RMN ¹³C (HSQC e HMBC, 500 MH_z, CD₃OD) (Figura 33 - Anexo XIII e Figura 34 - Anexo XIV): $\delta_{\rm C}$ 166,1 (C, C-2), 102,3 (CH, C-3), 142,1 (CH, C-4), 152,0 (C, C-6), 86,3 (CH, C-1'), 41,0 (CH₂, C-2'), 71,9 (CH, C-3'), 88,7 (CH, C-4'), 62,5 (CH₂, C-5') (YOUSSEF et al., 2015, ABOU-HUSSEIN et al., 2007).

Timidina (3) Sólido branco (6 mg); Ponto de fusão: 184.5-188 °C (YAN et al. 2015); UV_{máx}: 267 nm (SGARRELLA et al., 2007); *m/z* 265.0801 [M + Na]⁺ (DUAN et al., 2011) e 241.0828 [M – H]⁻ (WANG et al., 2009) (Figura 35 - Anexo XV e Figura 36 - Anexo XVI). Fórmula molecular: C₁₀H₁₄N₂O₅ (erro: + 1,6 ppm); RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) (Figura 37 - Anexo XVII e Figura 38 - Anexo XVIII): $\delta_{\rm H}$ 7,82 (s, H-4), 1,88 (d, *J*= 1,1 Hz, H-7), 6,28 (t, *J*= 6,6 Hz, H-1'), 2,20 (m, H-2'a) 2,24 (m, H-2'b), 4,39 (m, H-3'), 3,91 (m, H-4'), 3,72 (dd, *J*= 12,0, 3,6 Hz, H-5'a), 3,79 (dd, *J*= 12,0, 3,2 Hz, H-5'b); RMN ¹³C (HSQC e HMBC, 500 MH_z, CD₃OD) (Figura 39 - Anexo XIX e Figura 40 - Anexo XX): $\delta_{\rm C}$ 166,2 (C, C-2), 111,2 (C, C-3), 138,0 (CH, C-4), 152,2 (C, C-6), 12,0 (CH₃, C-7), 86,0 (CH, C-1'), 41,0 (CH₂, C-2'), 72,0 (CH, C-3'), 88,6 (CH, C-4'), 62,6 (CH₂, C-5') (YOUSSEF et al., 2015, LIN et al., 2007).

Adenosina (4) Sólido branco (9 mg); Ponto de fusão: 233-235 °C (ISHIKAWA et al., 2003); UV_{máx}: 259 nm (SGARRELLA et al., 2007); *m/z* 290.0867 [M + Na]⁺ (DUAN et al., 2011) e 266.0900 [M – H]⁻ (LIU et al., 2008) (Figura 41 - Anexo XXI e Figura 42 – Anexo XXII). Fórmula molecular: $C_{10}H_{13}N_5O_4$ (erro: + 1,5 ppm); RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) (Figura 43 -Anexo XXIII e Figura 44 - Anexo XXIV): $\delta_H 8,18$ (s, H-2), 8,32 (s, H-8), 5,97 (d, *J*= 6,4 Hz, H-1'), 4,74 (dd, J= 6,4, 5,2 Hz, H-2'), 4,33 (dd, J= 5,2, 2,5 Hz, H-3'), 4,18 (m, H-4'), 3,75 (dd, J= 12,5, 2,6 Hz, H-5'a), 3,89 (dd, J= 12,5, 2,5 Hz, H-5'b); RMN ¹³C (HSQC e HMBC, 500 MH_Z, CD₃OD) (Figura 45 - Anexo XXV e Figura 46 - Anexo XXVI): $\delta_{\rm C}$ 153,8 (CH, C-2), 149,8 (C, C-4), 120,8 (C, C-5), 157,4 (C, C-6), 141,6 (CH, C-8), 90,8 (CH, C-1'), 75,2 (CH, C-2'), 72,2 (CH, C-3'), 87,7 (CH, C-4'), 63,1 (CH₂, C-5') (JAMISON et al., 2014, WANG et al. 2009, CIUFFREDA et al., 2007).

2'-deoxiadenosina (5) Sólido branco (8 mg); Ponto de fusão: 186-188 °C (WALKER & BUTLER, 1956); UV_{máx}: 259 nm (SGARRELLA et al., 2007); *m/z* 274.0912 [M + Na]⁺ e 252.1097 [M + H]⁺ (DUAN et al., 2011) (Figura 47 - Anexo XXVII). Fórmula molecular: $C_{10}H_{13}N_5O_3$ (erro: - 0,8 ppm); RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) (Figura 48 - Anexo XXVIII e Figura 49 - Anexo XXIX): δ_H 8,18 (s, H-2), 8,33 (s, H-8), 6,43 (dd, *J*= 7,8, 6,0 Hz, H-1'), 2,41 (ddd, *J*= 13,4, 6,0, 2,5 Hz, H-2'a), 2,81 (ddd, *J*= 13,4, 7,8, 5,8 Hz, H-2'b), 4,58 (m, H-3'), 4,07 (m, H-4'), 3,74 (dd, *J*= 12,4, 3,2 Hz, H-5'a), 3,84 (dd, *J*= 12,4, 2,8 Hz, H-5'b); RMN ¹³C (HSQC e HMBC, 500 MHz, CD₃OD) (Figura 50 - Anexo XXX e Figura 51 - Anexo XXXI): δ_C 153,5 (CH, C-2), 149,7 (C, C-4), 120,6 (C, C-5), 157,3 (C, C-6), 141,4 (CH, C-8), 86,9 (CH, C-1'), 41,3 (CH₂, C-2'), 72,8 (CH, C-3'), 89,6 (CH, C-4'), 63,4 (CH₂, C-5') (CIUFFREDA et al., 2007).

D-Leucina (6) Sólido branco (22 mg); Ponto de fusão: 263-268 °C (LOSSE et al., 1959); *m/z* 132.1013 $[M + H]^+$ e 130.0858 $[M - H]^-$ (CHALCRAFT et al., 2009) (Figura 52 - Anexo XXXII e Figura 53 - Anexo XXXIII). Fórmula molecular: C₆H₁₃NO₂ (erro: - 6,1 ppm); RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) (Figura 54 - Anexo XXXIV e Figura 55 - Anexo XXXV): δ_H 3,55 (dd, *J*= 9,0, 4,1 Hz, H-2), 1,57-1,64 (m, H-3, H-4), 1,77 (m, H-3'), 0,98 (d, *J*= 5,8 Hz, H-5), 1,00 (d, *J*= 6,1 Hz, H-5'); RMN ¹³C (HSQC e HMBC, 500 MH_Z, CD₃OD) (Figura 56 - Anexo XXXVI e Figura 57 - Anexo XXXVII): δ_C 174,1 (C, C-1), 54,4 (CH, C-2), 41,7 (CH₂, C-3, C-3'), 25,5 (CH, C-4), 21,7 (CH₃, C-5), 22,9 (CH₃, C-5') (MENAHEM & MASTAI, 2006).

L-Fenilalanina (7) Sólido branco (7 mg); Ponto de fusão: 282-285 °C (CLIFFORD et al., 2009); m/z 166.0867 [M + H]⁺ (CATALIOTO et al., 2009) e 164.0700 [M - H]⁻ (Figura 58 - Anexo XXXVIII e Figura 59 - Anexo XXXIX). Fórmula molecular: C₉H₁₁NO₂ (erro: + 1,2 ppm); RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) (Figura 60 - Anexo XL e Figura 61 - Anexo XLI): $\delta_{\rm H}$ 7,31 (dd, *J*= 7,0, ≈0 Hz, H-3, H-3'), 7,34 (t, *J*= 7,0, H-4, H-4'), 7,26 (m, H-5), 3,75 (dd, *J*= 8,9, 4,3 Hz, H-6), 2,98 (dd, *J*= 14,4, 8,9 Hz, H-7a), 3,32 (dd, *J*= 14,4, 4,3 Hz, H-7b); RMN

¹³C (HSQC e HMBC, 500 MH_Z, CD₃OD) (Figura 62 - Anexo XLII e Figura 63 - Anexo XLIII): δ_{C} 174,2 (C, C-1), 137,4 (C, C-2), 130,3 (CH, C-3, C-3'), 130,2 (CH, C-4, C-4'), 128,4 (CH, C-5), 57,4 (CH, C-6), 38,4 (CH₂, C-7) (TREWEEKE et al., 2005, TIAN et al., 2002).

Nucleosídeos são componentes naturais de ácidos nucleicos e também estão envolvidos em vários processos biológicos chave de todas as células vivas (HU & YANG, 2014). Esta classe substâncias marcou o início da história dos produtos naturais marinhos (BERGMANN & FEENEY, 1951) e alguns nucleosídeos foram isolados na forma livre de vários organismos marinhos como tunicados, esponjas e estrelas-do-mar (HUANG et al., 2014). Nucleosídeos e seus derivados apresentaram diversas atividades biológicas importantes (MIKHAILOPULO & MIROSHNIKOV, 2011, JACOBSON et al., 2002).

Uridina (1) é um importante modulador bioquímico de 5-fluorouracil sendo eficaz contra tumores sólidos humanos (SAFARJALANI et al., 2005). Alguns análogos de timidina (3) são marcantes inibidores dos vírus da imumodeficiência humana (HIV) e herpes simplex (BALZARINI et al., 2006). Adenosina (4) é um neuromodulador que regula diversas respostas fisiológicas, incluindo vasodilatação e contribui para o processo de remodelagem vascular observado na hipertensão e na arteriosclerose (LI et al., 2009). Na medicina, a adenosina é um agente antiarrítmico no tratamento de taquicardia (ZEHENDER et al., 1996). Ainda, adenosina e 2'-deoxiadenosina (5) possuem atividade citotóxica frente a linfócitos T e granulócitos (BROX et al., 1982).

Esta é a primeira vez que se descreve o isolamento destes nucleosídeos (1-5) a partir de cianobactérias. A literatura reporta apenas o isolamento dos nucleosídeos citotóxicos e fungicidas tubercidina, toyocamicina e seus derivado 5'-α-D-glucopiranosídeos (STEWART et al., 1988) produzidos por cianobactérias.

2.5 Conclusões

Morfotipos semelhantes ao gênero *Leptolyngbya* e *Geitlerinema* forma isolados de amostras do perifíton coletado no litoral brasileiro. Este é o primeiro estudo mostrando a ocorrência de morfotipos *Geitlerinema* marinhos no Brasil. Estas linhagens correspondem a linhas filogenéticas distintas dos grupos típicos e de referência. Desta forma, acreditamos que o perfil metabólico também possa ser distinto. Assim, linhagens de cianobactérias coletadas em uma região ainda inexplorada, como as do presente trabalho, podem representar uma chave para a descoberta de novas substâncias.

A linhagem *Geilterinema* sp. CENA556 descrita neste estudo provou ser a nova fonte prolífica de várias substâncias com atividades biológicas importantes, especialmente nucleosídeos como a adenosina e a uridina. Isto ressalta que outros gêneros marinhos além de *Lyngbya*, *Moorea*, *Okeania* e *Symploca* são capazes de produzir metabólitos secundários bioativos.

A correta identificação taxonômica é um dos problemas enfrentados pela moderna ciência de cianobactérias. Ainda, de acordo com Komárek (2006, 2010), a abordagem química é um recurso importante que deve ser explorado no estudo da diversidade destes organismos. Desta forma, as substâncias majoritárias caracterizadas neste trabalho podem vir a serem consideradas como importantes marcadores quimiotaxonômicos para as linhagens de cianobactérias estudadas.

3 CAPÍTULO II - Estudo químico e biológico do cultivo misto entre a cianobactéria Geitlerinema sp CENA 556 e o fungo Trichoderma atroviride, endófito da alga marinha Bostrychia tenella

3.1 Introdução

Microrganismos marinhos são reconhecidos como uma fonte abundante de produtos naturais biologicamente ativos com estruturas moleculares excepcionais (BLUNT et al., 2016). Entre eles, fungos endofíticos de macroalgas apresentam ampla diversidade de espécies e destacam-se como uma excelente fonte tanto de novos compostos bioativos como também de compostos conhecidos provenientes de outras fontes (FLEWELLING et al., 2015; SINGH et al., 2015). Segundo Suryanarayanan e colaboradores (2010), algas vermelhas e marrons abrigam maior quantidade de diferentes espécies de fungos quando comparadas às algas verdes. Em relação aos fungos, os gêneros mais estudados são *Aspergillus* e *Penicillium*, isolados a partir de diversas espécies hospedeiras e localidades, os quais tem apresentado uma extensa variedade de bioatividades (FLEWELLING et al., 2015). De forma geral, fungos endofíticos de algas marinhas, destacam-se em particular pela produção de substâncias com atividade antimicrobiana (SINGH et al., 2015), levando muitos pesquisadores a considerá-la alvo prioritário para aplicações biotecnológicas e farmacêuticas.

Trichoderma sp é um gênero de fungos ascomicetos filamentosos, pertencente à família Hypocreaceae, com ampla distribuição, sendo encontrados no solo, associados a raízes de plantas terrestres ou endofíticos de plantas e algas marinhas (NISA et al., 2015; FLEWELLING et al., 2015; MUKHERJEE et al., 2012). Apresenta várias aplicações na indústria como fonte de enzimas, antibióticos, promotores de crescimento de plantas, decompositores de xenobióticos e biofungicidas comerciais (DRUZHININA et al., 2006; CHET & INBAR, 1994). Análises do genoma de espécies de *Trichoderma* revelaram um vasto repertório de genes envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários, como peptídeos não- ribossomais, policetídeos, terpenóides e pironas (MUKHERJEE et al., 2012). Investigações a respeito de sua química e bioatividades levaram a vários novos compostos, principalmente com ação antimicrobiana. Este gênero destaca-se principalmente na produção de peptídeos não pela presença de vários aminoácidos não proteinogênicos como α aminoisobutirato (Aib) e isovalina (Iva), acetilação no grupo N-terminal e um aminoálcool no grupo C-terminal (DANIEL & RODRIGUES FILHO, 2007). A partir de uma linhagem da espécie *Trichoderma longibrachiatum*, endofítica da alga marinha *Codium fragile*, foi isolado o antimicrobiano diterpênico harziandiona, primeiramente isolado da espécie *T. harzianum* (MIAO et al., 2012; GHISALBERTI et al., 1992).

Para a espécie *Trichoderma atroviride*, alvo deste estudo, foi descrito na literatura o isolamento de *peptaibols* antimicrobianos como as atroviridinas A (Figura 11) a C, neoatroviridinas, trichodermanin A e mais recentemente oito novas substâncias pertencentes à família de trichorzianinas (PANIZEL et al., 2013; SUN et al., 2011; DANIEL & RODRIGUES FILHO, 2007; OH et al., 2000). Dois sesquiterpenóides trichoderiol A (Figura 11) e B com ação anti-inflamatória também foram isolados (ZHENG et al., 2011). Cinco dipeptídeos cíclicos e três substâncias inéditas foram isoladas e caracterizadas por Sun e colaboradores (2009a, 2009b). Outras três estruturas, incluindo atroviridetide foram caracterizadas por Lu e colaboradores (2012). Grupos gênicos para a produção de sideróforos, que são sintetizados pela via peptídeo não ribossomal sintase (NRPS) e policetídeo sintase (PKS), também foram encontrados na espécie (MUKHERJEE et al., 2012)

Figura 11: Estrutura química de algumas substâncias isoladas de fungos da espécie *Trichoderma atroviride*.



Substâncias chamadas de sideróforos são metabólitos secundários de baixo peso molecular, com propriedade quelante, produzidos para facilitar a aquisição de ferro, elemento essencial para o crescimento de praticamente todos os microrganismos, a partir do meio ambiente (BUTLER & THEISEN, 2010; BUTLER, 2005). Sideróforos tem ganhado atenção recentemente por suas potenciais aplicações em diferentes campos como: ecologia (melhora o crescimento de vários microrganismos não cultiváveis), agricultura (promove o crescimento de plantas e melhora sua captação de ferro), biorremediação (atua contra alguns fitopatógenos e na detoxificação em amostra contaminadas com metais pesados), biosensor (detecção de ferro em diferentes ambientes) e medicina (SAHA et al., 2016). Na medicina são importantes para o tratamento de várias doenças e especialmente contra bactérias antibiótico-resistentes. Podem agir como "cavalos de Tróia" transportando agentes antimicrobianos para o interior de células bacterianas resistentes, por meio de conjugados entre sideróforo e agente antimicrobiano (HUANG et al., 2013). Desferal, fármaco baseado em sideróforos, é utilizado como adjuvante no tratamento talassemia e anemia falciforme, removendo o excesso de ferro no sangue gerado após processo de transfusão sanguínea (PIETRANGELO, 2002). O Desferal também ajuda na remoção de elementos transurânicos do corpo (NAGOBA & VEDPATHAK, 2011). Outras aplicações médicas incluem: antimalárica contra Plasmodium falciparum (TSAFACK et al., 1996); antitumoral, como as desferroxiaminas e outros sideróforos (BUSS et al., 2003; LOVEJOY & RICHARDSON, 2003; MIETHKE & MAHAHIEL, 2007); Em ensaios in vitro, apresentam também atividades anti-inflamatória, antioxidante, antitumoral e antibacteriana (FAZARY et al., 2016; ITO et al., 2016).

Fato comum entre ascomicetos, espécies de *Trichoderma* podem produzir sideróforos para crescer em condições de escassez de ferro e para competir com seus hospedeiros pelo ferro disponível (MUKHERJEE et al., 2012). Em estudos sobre produtos naturais de fungos marinhos foi observado que a maioria é capaz de secretar sideróforos do tipo hidroxamato ou carboxilato, no entanto a produção de sideróforos do tipo catecolato é relativamente rara (HOLINSWORTH & MARTIN, 2009).

Fungos endofíticos, além de fonte para a prospecção de produtos naturais, são também alvo de pesquisas para a otimização da produção de metabólitos secundários bioativos. No entanto, duas generalizações podem ser feitas a cerca de genes de metabólitos secundários fúngicos: eles são frequentemente encontrados em grupos e muitos não são expressos em condições laboratoriais, fenômeno conhecido como silenciamento gênico, o qual pode restringir a identificação de novos compostos (MUKHERJEE et al., 2012).

Assim, é pertinente considerar que os metabólitos secundários de um fungo podem estar relacionados ao seu respectivo nicho ecológico e que as interações metabólicas contínuas entre fungos e outros organismos podem aumentar a síntese de metabólitos secundários (NISA et al 2015). Alguns destes metabólitos dão aos fungos marinhos a superioridade para se adaptarem em habitats extremos, competirem por substratos e afastar ameaças. Além disso, a produção de metabólitos pelos fungos pode ser afetada pela sua fonte de isolamento, incluindo esponjas ou outros invertebrados, em cujos tecidos eles estão se abrigando ou vivendo (MOGHADAMTOUSI et al., 2015).

Neste contexto, o cultivo misto entre diferentes microrganismos, ao invés de culturas independentes, é uma abordagem usualmente praticada em microbiologia para promover interações diretas que podem estimular o acúmulo de produtos naturais presentes constitutivamente ou induzir à expressão de vias biossintéticas silenciadas levando à produção de novos compostos (ANGELIS et al., 2012; BRAKHAGE, 2013; OLA et al., 2013; SANTOS & REIS, 2014; WREDE et al, 2014). Estudo com fungos associados da água viva *Nemopilema nomurai*, envolvendo cultivo independente e cultivo misto entre eles, mostraram que houve diferenças nos níveis da produção de metabólitos antibacterianos e antifúngicos produzidos (YUE et al., 2015). Cultivo misto entre o fungo endofítico *Fusarium tricinctum* com a bactéria *Bacillus subtilis* resultou em aumento no acúmulo de metabólitos secundários constitutivos e produção de quatro produtos naturais com atividade antibacteriana detectados apenas no cocultivo (OLA et al., 2003). A produção de N-formil alcalóides pelo fungo *Aspergillus fumigatus* foi induzida pelo cultivo-misto com a bactéria *Streptomyces peucetius*, dando origem a uma substância com propriedade citotóxica (ZUCK et al., 2011).

Estudos relacionados ao cultivo misto entre cianobactérias e fungos ainda são escassos na literatura. Temos o cultivo misto entre a cianobactéria *Spirulina platensis* e os fungos *Trametes versicolor*, *Agaricus blazei* e *Chlorella vulgaris*, visando à produção de biomassa e exopolissacarídeos para fins industriais (ANGELIS et al., 2012). *Trichoderma citrinoviride* em cultivo misto com a cianobactéria *Microcystis aeruginosa* para fins de controle de florações e biorremediação (MOHAMED et al., 2014). Assim, até o momento, nenhuma pesquisa visando à produção de fármacos foi descrita. A associação (fungo e cianobactéria), no entanto, não é uma novidade, ela existe naturalmente a mais de 400 milhões de anos, na forma de líquens (WREDE et al, 2014). Estes que, por sua vez, podem ser formados pela associação entre fungos e algas ou fungos e cianobactérias, apresentam características interessantes como a produção de metabólitos secundários com aplicação na indústria farmacêutica, alimentícia, cosmética e etc (SUZUKI et al., 2016; SANTOS & REIS, 2014).

Assim, o estudo proposto neste trabalho tem uma carácter inovador, mimetizando em laboratório uma possível relação ecológica com o objetivo de explorar o potencial metabólico dos microrganismos envolvidos.

3.2 Objetivos

O objetivo geral do trabalho foi realizar um estudo químico em busca de substâncias com potencial farmacológico produzidas durante o cultivo misto entre a linhagem de cianobactéria *Geitlerinema* sp CENA 556 e o fungo *Trichoderma atroviride*, endófito da alga marinha *Bostrychia tenella*. Desta forma, os objetivos específicos foram:

Cultivar o fungo endofítico *T. atroviride* em meios diferentes e a cianobactéria *Geitlerinema* sp CENA556 em meio específico e determinar o perfil químico da fração polar MeOH/ H2O (95:5) dos extratos por CCDC e CLAE-DAD;

Realizar o cultivo misto entre a linhagem de cianobactéria *Geitlerinema* sp CENA556 e o fungo *T. atroviride* e avaliar (por meio de CLAE-DAD) a influência na produção de metabólitos secundários por ambos, comparando com o perfil obtido das culturas isoladas;

Proceder ao isolamento e à elucidação estrutural dos constituintes majoritários do(s) extrato(s) do(s) cultivo(s) misto(s) mais promissor(es);

Avaliar o potencial biológico da(s) substância(s) purificada(s).

3.3 Material e Métodos

3.3.1 Procedimentos gerais

3.3.1.1 <u>Equipamentos e softwares</u>

A instrumentação analítica utilizada foi: Balança semi-analítica (modelo FA-2204CI-BI, Bioscale, São Paulo, Brasil); Espectrômetros de RMN (modelos DRX 400 e DRX 500, Bruker, Billerica, MA, EUA) (Departamento de Química, Faculdade de Ciências, Filosofia e Letras de Ribeirão Preto – USP); Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (modelo LC-6AD, Shimadzu, Kyoto, Japão) com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) (modelo SPD-M10A, Shimadzu) (Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – NPPNS/FCFRP/USP); Cromatógrafo Líquido (Modelo Alliance 2695, Waters, Milford, MA, EUA) acoplado a Espectrômetro de Massas (Modelo ZQ 2000, Waters) com ionizador eletrospray e analizador quadrupolo (NPPNS/FCFRP/USP); Polarímetro (modelo P- 300, Jasco, Japão); Ponto de Fusão (modelo 431, Fisatom, São Paulo, Brasil).

Equipamentos de uso geral: Capela de fluxo laminar (Pachane, Piracicaba, SP, Brasil); Sistema ultrapurificador de água Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA); Autoclave vertical (Phoenix, Araraquara, SP, Brasil); Evaporador rotativo (Buchi, modelo R-210); Centrífuga; Bomba a vácuo; E lavadora ultrassônica.

Os *softwares* utilizados foram: Shimadzu Class VP HPLC software; Waters MassLynx LC-MS software; Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) software; Portable MestReNova 6.0.2 (Mestrelab Research); E ChemBioDraw Ultra (Perkin Elmer).

3.3.1.2 Solventes, materiais diversos e meios de cultura

Placas de sílica F-254 nm impregnadas em alumínio (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha); Coluna analítica C8 (250 x 4,6mm - ShimadzuShim-pack); Coluna semipreparativa C8 (250 x 20mm, Shimadzu Shim-pack), Solventes de grau HPLC: Acetonitrila (JT Baker); Solvente deuterado: $CDCl_3$ (Sigma-Aldrich); Solventes de grau analítico: metanol, acetato de etila, n-hexano, diclorometano, dimetilsulfóxido, etc.

Os meios de cultura utilizados foram: ASNIII (RIPPKA et al., 1979) suplementado com vitamina B_{12} (0,01 mg/ mL), arroz parboilizado e Czapek.

3.3.2 Microrganismos

Para o experimento de cultivo misto, foi utilizado o fungo filamentoso endofítico Trichoderma atroviride, isolado a partir da alga marinha Bostrychia tenella, coletada nos Costões Rochosos da Praia Dura (23°30'6,30"S/ 45°10'27,50"O), em Ubatuba, litoral norte do Estado de São Paulo. O isolamento foi realizado pelo Dr. Rafael de Felício (FELÍCIO, 2010) durante o seu mestrado. Para tanto, o material algal foi coletado, acondicionado em recipiente contendo água do mar esterilizada contendo cloranfenicol (200 mg/ L) e transportado sob refrigeração para o Laboratório de Química Orgânica do Ambiente Marinho (FCFRP-NPPNS-USP). A superfície das algas foi esterilizada com solução de etanol a 70% ou hipoclorito de sódio e fragmentos foram semeados em meios de cultura sólidos e incubados a 30 °C, de acordo com metodologia descrita por Kjer e colaboradores (2010). Repicagens sucessivas dos microrganismos que se desenvolveram ao redor dos fragmentos de alga foram realizadas para obtenção de linhagens isoladas. Estas foram então preservadas em vaselina líquida (ARAÚJO et al., 2002). A linhagem de fungo endofítico codificada como T06 encontra-se preservada no Laboratório de Química Orgânica do Ambiente Marinho (FCFRP-NPPNS-USP) (Figura 12). A identificação taxonômica da linhagem como T. atroviride foi realizada no CPQBA (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas - Unicamp), sob responsabilidade de Dra Lara Durães Sette. A metodologia utilizada foi a de taxonomia molecular com extração de DNA genômico, amplificação por PCR da região D1/D2 (DNAr 28S) e ITS, sequenciamento dos fragmento purificados e análise filogenética por comparação com sequências de organismos contidas nas bases de dados GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) e CBS (www.cbs.knaw.nl). As sequências foram alinhadas utilizando o programa CLUSTAL X (THOMPSON et al., 1994) e as análises filogenéticas foram conduzidas utilizando o programa MEGA 3.0 (KUMAR et al., 2004).



Figura 12: Fungo endofítico (linhagem T06) isolado a partir da alga marinha *B. tenella*. Fonte: FELÍCIO, 2010

A coleta, isolamento e análise filogenética da linhagem de cianobactéria *Geitlerinema* sp CENA556 utilizada no experimento de cultivo misto está detalhadamente descrita no capítulo I deste trabalho.

3.3.3 Cultivos isolados do fungo endofítico T. atroviride e da cianobactéria Geitlerinema sp CENA556, extração e caracterização da fração polar MeOH/ H₂O (95: 5) por CLAE-DAD

O fungo T. atroviride T06 foi cultivado em meio arroz e meio Czapek durante 28 dias. O cultivo em arroz foi realizado em 30 frascos tipo Erlenmeyer de 500 mL contendo 90 g de arroz umedecido e autoclavado com 100 mL de meio ASNIII suplementado com vitamina B₁₂ (0,01 mg/ mL). A extração foi realizada utilizando 120 mL de uma mistura de diclorometano/ metanol (2:1) por duas vezes, seguida por uma extração com 120 mL de acetato de etila 100%. Em seguida o sobrenadante foi filtrado e concentrado em evaporador rotativo gerando o extrato T06_Ar, com rendimento de 22,0 g. Para o cultivo em Czapek, foram utilizados 20 frascos tipo Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio Czapek suspenso em meio ASNIII suplementado com vitamina B₁₂ (0,01 mg/ mL). A extração foi realizada utilizando a mesma sequência de solventes, sendo realizadas partições líquido-líquido, onde as fases orgânicas foram reunidas e concentradas, obtendo-se o extrato T06_Cz, com rendimento de 0,99 g. Os extratos forma concentrado em evaporador rotativo e submetidos à partição líquido-líquido, utilizando 100 mL de uma mistura de metanol/água (95:5) a qual foi extraída por 3 vezes com 50 ml de hexano. Desta forma obteve-se uma fração apolar (hexânica) e uma fração polar (metanol/ água 95:5). As frações metanol/ água (95:5) foram preparadas em acetonitrila e água na concentração de 10 mg/mL e analisadas em CLAE-DAD, em coluna analítica C8, seguindo o gradiente exploratório de acetonitrila em água: 0 min – 2% CH₃CN; 40 min – 100% CH₃CN; 50 min – 100% CH₃CN; 55min – 2% CH₃CN; e 60 min – 2% CH₃CN, com fluxo de 1 mL/min e volume de injeção de 20 μ L.

O cultivo e a extração da cianobactéria *Geitlerinema* sp CENA556 estão descritos no item 2.4.4 do capítulo I deste trabalho. Da mesma forma que os extratos do fungo, o extrato obtido a partir da cianobactéria (CENA556_ASNIII) foi fracionado em fração hexânica e fração metanol/ água (95:5). Para que se estabelecesse um comparativo entre os metabólitos do fungo nos diferentes meios e da cianobactéria utilizou-se condições similares de análise por CLAE-DAD para as amostras da fração metanol/ água (95:5) de cada cultivo.

Extratos dos meios de cultura utilizados (brancos) foram obtidos nas mesmas condições que os extratos das culturas dos microrganismos e foram analizados nas mesmas condições cromatográficas.

3.3.4 Cultivos mistos entre a linhagem de cianobactéria Geitlerinema sp CENA556 e o fungo T. atroviride T06 e avaliação do perfil químico por CCDC e CLAE-DAD das frações polares dos extratos obtidos

O cultivo misto foi realizado de três formas diferentes (estágios I, II e III) (Figura 13), sendo que os estágios I e II corresponderam a culturas pré-estabelecidas de fungos que foram adicionadas com cianobactérias. O estágio III, por sua vez, correspondeu a culturas pré-estabelecidas de cianobactérias adicionada de fungos.

Figura 13: Esquema representando os estágios do cultivo misto entre a cianobactéria *Geitlerinema* sp CENA556 e o fungo *T. atroviride* T06



No estágio I, o fungo *T. atroviride* T06 foi cultivado em 20 frascos tipo Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio de cultura Czapek (preparado em meio ASNIII suplementado com vitamina B_{12}), durante 7 dias e então 5 mL de meio contendo alguns filamentos da cianobactéria CENA556 foram adicionados a cada frasco de cultivo. Mantevese o cultivo misto durante 28 dias, em temperatura de 24±1 °C, em ausência de luz.

No estágio II, o fungo T06 foi cultivado por 7 dias em 20 frascos tipo Erlenmeyer contendo 90 g de arroz umedecido e autoclavado com 100 mL de meio ASNIII suplementado com vitamina B_{12} . Em seguida, foram adicionados 50 mL do meio contendo filamentos da cianobactéria CENA556 a cada frasco de cultivo. Manteve-se o cultivo misto durante 28 dias, em temperatura de 24±1 °C, em ausência de luz.

No estágio III, cultivou-se a cianobactéria CENA556 durante 60 dias, utilizando 20 frascos tipo Erlenmeyer de 1 L contendo 500 mL de meio ASNIII suplementado com vitamina B_{12} . Após este período, adicionou-se 10 plugues do fungo T06 cultivado em placas de Petri com meio sólido PDB. Manteve-se o cultivo misto durante 28 dias, em temperatura de 24±1 °C, sob iluminação fluorescente em fotoperíodos de 14 h claro: 10 h escuro.

Após os períodos de incubação, os extratos foram obtidos conforme o método descrito no Item 3.3.3 para os estágios I e II, obtendo-se desta forma os extratos T06CENA556_Cz (0,82 g) e T06CENA556_Ar (15,3 g), respectivamente. Para o terceiro estágio, procedeu-se a extração conforme descrito no Item 2.4.4, obtendo-se o extrato CENA556T06_ASNIII (4,33 g). Os extratos foram submetidos à partição líquido-líquido, obtendo-se uma fração hexânica e uma fração metanol/ água (95:5).

As frações metanol/ água (95:5) foram preparadas em água e acetonitrila na concentração de 10 mg/mL e analisadas em CLAE-DAD, em coluna analítica C8, seguindo o gradiente exploratório de acetonitrila em água descrito no Item 3.3.3. Os cromatogramas obtidos foram comparados àqueles das frações metanol/ água (95:5) dos extratos T06_Cz, T06_Ar e CENA556_ASNIII obtidos nas mesmas concentrações e condições cromatográficas.

Análises de CCDC também foram realizadas em cromatoplacas de sílica gel F-254 para comparar o perfil cromatográfico das frações metanol/ água (95:5) provenientes do cultivo misto e das culturas dos microrganismos isolados. Foram utilizados como reveladores luz ultravioleta a 254 nm e cloro-iodoplatinado.

3.3.5 Isolamento e identificação estrutural das substâncias obtidas da fração polar do extrato T06CENA556_Cz proveniente do cultivo misto

A fração metanol/ água (95: 5) foi submetida à CLAE semipreparativa em coluna C8, a temperatura ambiente, seguindo o gradiente de acetonitrila em água: 0 min – 10% CH₃CN; 60 min – 45% CH₃CN; 70 min – 45% CH₃CN; 75 min – 100% CH₃CN; 80 min – 100% CH₃CN; 85 min – 10% CH₃CN; e 90 min – 10% CH₃CN, com fluxo de 10 mL/ minuto e volume de injeção de 1mL na concentração de 100 mg/ mL. Frações correspondentes aos picos do cromatograma foram coletados, concentradas em rotaevaporador e as substâncias isoladas foram caracterizadas por experimentos de RMN uni (¹H) e bidimensionais (COSY¹H¹H, HSQC e HMBC), usando CDCl₃ como solvente. Além disso, foram obtidos espectros de massas de alta resolução (ESI-TOF), por infusão direta.

3.3.6 Avaliação do potencial biológico da substância majoritária purificada a partir da fração polar do extrato T06CENA556_Cz

A substância majoritária do cultivo misto em Czapek foi avaliada quanto ao seu potencial antibacteriano. Os experimentos foram realizados no laboratório de Farmacognosia (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP), com nossa participação e colaboração da técnica Maria Angélica dos Santos Cunha Chellegatti sob supervisão da Profa. Dra. Niege A. J. C. Furtado.

Para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) 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. Os microrganismos ensaiados foram Staphylococcus aureus, S. saprophyticus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Proteus mirabilis e Klebsiella pneumoniae. Foram utilizados como controles positivos os padrões dos antibióticos Penicilina G (para S. aureus, K. pneumoniae e S. saprophyticus) e Estreptomicina (para E. coli, P. aeruginosa e P. mirabilis) em diluição seriada nas concentrações de 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125; 0,1562; 0,0781; 0,0391; 0,0195; 0,0098; 0,0049 µg de antibiótico por mL de meio em cada poço. Para o preparo das amostras, procedeu-se uma diluição seriada em meio Mueller Hinton (MH) caldo de modo a obter as concentrações de 400; 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,5625; 0,7812; 0,3906; 0,1953 µg de amostra por mL de meio em cada poço. As placas foram incubadas a 37 °C em estufa bacteriológica por 24 hs. Após o tempo de incubação foi adicionado em cada poço 20µL de resazurina 0,02% preparado em água. Após 15 a 30 minutos observou-se a mudança de coloração de cada poço. Em caso de crescimento bacteriano, ocorre mudança de azul para o rosa devido a uma reação de oxi-redução.

Foi realizado também um teste para determinar a concentração bactericida mínima (CBM), em que, antes de revelar a placa com Resazurina 0,02 %, retirou-se amostra dos pocinhos de amostra e de controle positivo com uma haste autoclavada e transferiu-se para Placas de Petri contendo meio ágar MH. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas e procedeu-se à leitura visual. O resultado da leitura é baseado em crescimento ou ausência de crescimento.

3.4 Resultados e discussão

3.4.1 Avaliação do perfil dos extratos provenientes do cultivo misto entre a linhagem de cianobactéria Geitlerinema sp CENA556 e o fungo T. atroviride T06 e comparação com o perfil dos extratos obtidos das culturas dos microrganismos isolados

A princípio, na comparação visual do cultivo do fungo *T. atroviride* T06 isolado e em cultivo misto com a cianobactéria *Geitlerinema* sp CENA556 em meio Czapek (Estágio I – Item 3.3.4) foi observada uma mudança de coloração, evidenciando que houve diferença em um ou mais constituintes químicos presentes nas diferentes culturas ao final de 28 dias (Figura 14). Ainda, de acordo com as análises por CCDC (Figura 15), foi possível observar que o fungo T06 cultivado em arroz apresentou uma maior variedade de substâncias em relação ao cultivado em Czapek. Já o fungo em cultivo misto com a cianobactéria em Czapek (Estágio 1) apresentou produção de substâncias diferentes e/ou em maior quantidade do que os fungos cultivados isoladamente. Na presença do revelador cloro-iodoplatinado, estas substâncias revelaram-se como manchas claras, indicativas de compostos nitrogenados. A cianobactéria CENA556, por sua vez, apresentou produção de compostos nitrogenados, no entanto uma menor produção de metabólitos com absorção no UV.

Figura 14: Aspectos das culturas isolada e mista do fungo *T. atroviride*. (a) Fungo *T. atroviride* T06 cultivado em meio Czapek (28° dia). (b) Fungo *T. atroviride* T06 em cultivo misto com a cianobactéria *Geitlerinema* sp CENA556 em meio Czapek (28° dia).



Figura 15: CCD comparativa das frações MeOH/ H2O (95:5) dos extratos brutos obtidos do fungo *T. atroviride* e da cianobactéria *Geitlerinema* sp CENA556 isolados e em cultivo misto: **1.** T06_Ar; **2.** T06_Cz; **3.** T06CENA556_Cz; **4.** CENA556_ASNIII. (**a**) Fase móvel: Hex/AcOEt (4:1), revelador: luz UV 254 nm; (**b**) Fase móvel: Hex/AcOEt (4:1), revelador: cloro-iodoplatinado; (**c**) Fase móvel: Hex/AcOEt (1:1), revelador: luz UV 254 nm; (**d**) Fase móvel: Hex/AcOEt (1:1), revelador: cloro-iodoplatinado. As setas vermelhas indicam a presença de substâncias cuja produção pode ter sido estimulada pelo cultivo misto.



Nas análises por CLAE-DAD das frações MeOH: H₂O dos extratos foi possível observar que no primeiro estágio do cultivo misto, o fungo *T. atroviride* T06 na presença da cianobactéria *Geitlerinema* sp CENA556 em meio Czapek produziu uma ou mais substâncias majoritárias, diferentes daquelas produzidas pela cultura do fungo isolado (Figura 16), fato que pode ser atribuído a um estímulo do processo de modulação da transcrição de genes que estavam silenciados sob as condições de cultivo em laboratório (BRAKHAGE, 2013).

No segundo estágio (cultivo misto em arroz) observou-se que houve mudança no perfil das substâncias produzidas pelo fungo (Figura 17), no entanto a produção de substâncias diferentes daquelas já produzidas pelo fungo em cultura individual foi menos significativa do que a observada para o meio Czapek.

No terceiro estágio foi possível observar que, quando cultivada na presença do fungo *T. atroviride* T06 em meio ASNIII, a cianobactéria *Geitlerinema* sp CENA556 apresentou menor produção de metabólitos secundários quando comparada à cultura desta cianobactéria isolada (Figura 18), sugerindo uma inibição da cianobactéria por parte do fungo.

De forma semelhante, já havia sido reportado na literatura um estudo de cultivo misto entre a cianobactéria *S.platensis* e os fungos *T. versicolor*, *A. blasei* e *C. vulgaris* visando à produção de biomassa e exopolissacarídeos. Neste estudo foi descrito um aumento sinergético e aditivo na produção destes componentes, porém com predominância de metabólitos produzidos pelo fungo e apenas traços de metabólitos produzidos pela cianobactéria (ANGELIS et al., 2012). Outro estudo demonstrou que o fungo *Trichoderma citrinoviride* foi capaz não só de inibir o crescimento da cianobactéria *M. aeruginosa* como também de degradar a cianotoxina microcistina produzida pela mesma (MOHAMED et al., 2014).

Diante destas considerações, o cultivo misto entre *T. atroviride* T06 e *Geitlerinema* sp CENA556 e em meio Czapek foi a primeira escolha para continuar o estudo visando isolar e identificar as substâncias majoritárias produzidas.

Figura 16: Cromatograma das frações metanol:água (95:5) dos extratos do fungo *T. atroviride* e da cianobactéria *Geitlerinema* sp CENA556 isolados e em cultivo misto em Czapek: cultivo misto (T06CENA556_Cz) (preto), fungo isolado (T06_Cz) (azul) e extrato do meio Czapek sem microrganismos (amarelo). A seta vermelha evidencia o pico referente às substâncias produzidas durante o cultivo misto.



Figura 17: Cromatograma das frações metanol:água (95:5) dos extratos do fungo *T. atroviride* e da cianobactéria *Geitlerinema* sp CENA556 isolados e em cultivo misto em arroz: cultivo misto (T06CENA556_Ar) (preto), fungo isolado em arroz (T06_Ar) (rosa) e extrato do meio arroz sem microrganismos(amarelo).


Figura 18: Cromatograma das frações metanol:água (95:5) dos extratos do fungo *T. atroviride* e da cianobactéria *Geitlerinema* sp CENA556 isolados e em cultivo misto em ASNIII: cultivo misto (CENA556T06_ASNIII) (azul), cianobactéria isolada em meio ASNIII (CENA556_ASNIII) (preto) e extrato do meio ASNIII sem microrganismos (amarelo).



3.4.2 Isolamento e identificação estrutural das substâncias obtidas da fração polar do extrato T06CENA556_Cz proveniente do cultivo misto

Por meio de CLAE-DAD semi-preparativa foi possível isolar quatro sideróforos tipo catecolato a partir da fração polar MeOH/ H_2O (95:5) do extrato T06CENA556_Cz proveniente do cultivo misto. Três destas foram identificadas como as substâncias já descritas agrobactina A (Figura 19-8), fotobactina (Figura 19-9) e agrobactina (Figura 19-10). Um novo sideróforo tricatecol (**11**) (Figura 19-11), estreitamente relacionado com a agrobactina, foi identificado.

A caracterização destas substâncias é mostrada a seguir. Os dados de deslocamento químico de ¹³C foram obtidos por meio das análises de RMN bidimensional (HSQC e HMBC):

Agrobactina A (8) Sólido branco (2,1 mg); $UV_{máx}$: 250 e 311 nm (ONG et al.; 1979); m/z 677.2432 $[M + Na]^+$ e 653,2487 $[M - H]^-$ (Figura 64 - Anexo XLIV e Figura 65 - Anexo XLV); Fórmula molecular: $C_{32}H_{38}N_4O_{11}$ (erro: + 7,4 ppm); Os dados de RMN de ¹H são mostrados na Tabelas 2 (Figura 66 - Anexo XLVI e Figura 67 - Anexo XLVII).

Fotobactina (9) Sólido branco (3,0 mg); UV_{máx}: 251 e 313 nm (CICHE et al.; 2003); *m/z* 466.1559 [M + Na]⁺ e 442.1602 [M – H]⁻ (CICHE et al.; 2003) (Figura 68 - Anexo XLVIII e Figura 69 - Anexo XLIX); Fórmula molecular: C₂₂H₂₅N₃O₇ (erro: + 5,7 ppm); RMN ¹H (500 MH_z, CDCl₃) (Figura 70 - L e Figura 71 - Anexo LI): $\delta_{\rm H}$ 4,41 (d, *J* = 7,5 Hz, H-15), 4,89 (m, *J* = 6,4 Hz, H-16), 1,62 (d, *J* = 6,4, H-24), 6,45 (s_{largo}, H-8), 6,83 (s_{largo}, H-13), 1,66 (m, H-10 e 11), 3,34 - 3,51 (m, H-9 e 12), 6,76 - 7,23 (m, 9H, H-3, 4, 5, 21, 22 e 23), 12,84 (s_{largo}, H-1, 2, 19, 20); RMN ¹³C (HSQC e HMBC, 500 MH_z, CDCl₃) (Figura 72 - Anexo LII e Figura 73 - Anexo LIII): $\delta_{\rm C}$ 149,30 (C, C-1), 146,47 (C, C-2), 118,11 (CH, C-3), 118,69 (CH, C-4), 121,38 (CH, C-5), 114,12 (C, C-6), 170,38 (C, C-7), 38,62 (CH₂, C-9), 26,62 (CH₂, C-10 e 11), 39,06 (CH₂, C-12), 170,94 (C, C-14), 74,06 (CH, C-15), 87,25 (CH, C-16), 167,79 (C, C-17), 147, 23 (C, C-19), 144,99 (C, C-20), 118,59 (CH, C-21), 119,44 (CH, C-22), 119,36 (CH, C-23), 21,66 (CH₃, C-24) (CICHE et al., 2003).

Agrobactina (10) Sólido branco (53 mg); mp 110-115 °C (PETERSON et al., 1980); UV_{máx}: 250 e 311 nm (ONG et al.; 1979); m/z 659.2322 [M + Na]⁺ e 635,2334 [M – H]⁻ (Figura 74 - Anexo LIV e Figura 75 - Anexo LV); Fórmula molecular: C₃₂H₃₆N₄O₁₀ (erro: + 0,2 ppm); Os dados de RMN são mostrados nas Tabelas 2 e 3 (Figura 76 - Anexo LVI, Figura 77 - Anexo LVII, Figura 78 - Anexo LVIII e Figura 79 - Anexo LIX).

N-(4-(2,3-diidroxibenzamida)butil)-2-(2,3-diidroxifenil)-N-(3-(2-hidroxi-3 metoxibenzamida)propil)-4-metil-4,5-diidrooxazol-5-carboxamida (11)

Sólido branco (2,4 mg); UV_{máx}: 251 e 313 nm; m/z 673.2451 [M + Na]⁺ e 649,2474 [M – H]⁻ (Figura 80 - Anexo LX e Figura 81 - Anexo LXI); Fórmula molecular: C₃₃H₃₈N₄O₁₀ (erro: + 4,0 ppm); Os dados de RMN são mostrados nas Tabelas 2 e 3 (Figura 82 - Anexo LXII, Figura 83 - Anexo LXIII, Figura 84 - Anexo LXIV e Figura 85 - Anexo LXV).



Figura 19: Sideróforos isolados a partir da fração MeOH/ H_2O (95:5) do extrato T06CENA556_Cz proveniente do cultivo misto.

δH (multiplicidade, H-n, J)					
	Agrobactina A (8)	Agrobactina A (Bergeron et al., 1983, 300 MHz, CDCl ₃)	Agrobactina (10)	Agrobactina (Ong et al., 1979, 220 MHz, DMSO- d6)	(11)
<u>Treonina</u>					
NH	7,32 (d, H-17,	7,9 (d, H-17,	-	-	-
	<i>J</i> = 8,6)	<i>J</i> NHα= 7,9)			
αCH	4,95 (dd, H-15,	5,02 (d, H-15,	4,65 (d, H-15	4,6 (d, H-15,	4,67 (d, H-15,
0.077	J=9,0,6,1)	$J\alpha NH= 8,4)$	J=6,9)	J=6,4)	J=6,9)
βСН	4,21 (m, H-16,	4,18 (d, H-16,	5,51 (m, H-16,	5,5 (m, H-16,	5,50 (m, H-16,
	J = 6,4)	$J\alpha\beta = 2,7$	J = 6, 6)	$J\alpha\beta = 6,8,$	J=6,6)
CH	1.01 (1.11.04	$J\beta\gamma = 6,1$	151(11104	$J\beta\gamma = 6,4)$	1 51 (1 11 04
γCH ₃	1,21 (d, H-24,	1,20 (d, H-24, L-0(2))	1,51 (d, H-24,	1,5 (d, H-24,	1,51 (d, H-24,
OH.	J=6,2)	$J = \beta \gamma (0, 3)$	J= 6,4)	J = 6,4)	J=0,4)
UH Esnormidino	NO	$4,7 (S_{largo}, H-10)$	-	-	-
<u>Esperintanta</u>	778(+ 119	803 o 8 24 (t H	800(t U 8	8 2 (t H 08	800(t U8
ΝΠ	I_{-} 5 4)	8,03 е 8,24 (l, п-	$\delta_{,00}$ (t_{largo} , Π - $\delta_{,00}$	о,2 (l, п-0о, 28)	$\delta_{\rm r},00~(l_{\rm largo}, \Pi-\delta, I_{\rm largo}, I_{\rm r}-\delta, I_{\rm r}-\delta,$
	J = J, +) 6 72 (t. H	0, 20)	J = J, +) 6.54 (t. H.28	28)	J = J, J 6.83 (t. H.28
	0,72 (q _{argo} , 11-		$J_{-5,0}$ (I_{argo} , 11-20, $I_{-5,0}$)		$(l_{argo}, 11-20, I_{-} 5.9)$
	I = 5.4		J- J,+)		J = J, J
CCH ₂ C	1.62 - 1.83	1.5 - 2.1	1.73 - 1.83	1.7	1.78 - 1.82
2 -	(m, H-10, 11,	(m, H-10, 11, 26)	(m, H-10, 11,	(m, H-	(m, H-10, 11, 26)
	26)		26)	10,11,26)	
CCH ₂ N	3,32 - 3,72 (m,	3,15 - 3,75 (m,	3,33 - 3,67 (m,	3,5 (m, H-9,	3,34 - 3,62 (m,
	H-9, 12, 25, 27)	H-9, 12, 25, 27)	H-9, 12, 25, 27)	12, 25, 27)	H-9, 12, 25, 27)
<u>Aromáticos</u>					
СН	6,97 (dd, H-3)	6,70 - 7,22	7,00 (dd, H-3)	6,6 - 7,2	7,00 (dd, H-3)
	6,72 (t, H-4)	(9H, m)	6,75 (t, H-4)	(9H, m)	6,75 (t, H-4)
	7,06 (dd, H-5)		7,12 (dd, H-5)		7,12 (dd, H-5)
	7,03 (dd, H-21)		7,05 (dd, H-21)		7,04 (dd, H-21)
	6,82 (t, H-22)		6,80 (t, H-22)		6,80 (t, H-22)
	7,09 (dd, H-23)		7,21 (dd, H-23)		7,20 (dd, H-23)
	7,04 (dd, H-33)		7,02 (dd, H-33)		6,94 (dd, H-33)
	6,72 (t, H-34)		6,72 (t, H-34)		6,79 (t, H-34)
	6,90 (dd, H-35)		6,89 (dd, H-35)		7,15 (dd, H-35)
(OH)	12,64 (s, H-2,	12,0 e 13,0	12,59 (s _. H-2, 20,	8,1 (s _. H-2,	11,32 (s _, H-2, 20,
	20, 32)		32)	20, 32)	32)
	12,89 (s, H-1,		12,91 (s, H-19)	11,8 (s, H-19)	12,65 (s, H-19)
	19, 31)		13,01 (s _, H-1, 31)	12,7 (s _, H-1,	13,02 (s _. H-1, 31)
				31)	
CH ₃	-	-	-	-	3,88 (s, H-36)

Tabela 2: Dados de RMN de ¹H das substâncias (8), (10) e (11) em CDCl₃, 500 MHz e valores de referência da para agrobactina A e agrobactina.

	Agrobactina (10)	(11)
Posição	δC*	
1 (C)	149,3	149,2
2 (C)	145,7	145,7
3 (CH)	117,9	117,9
4 (CH)	118,7	118,8
5 (CH)	116,5	116,6
6 (C)	114,2	114,2
7 (C)	170,2	170,1
9 (CH ₂)	35,5	35,6
10, 11 (CH ₂)	27,0	27,1
12 (CH ₂)	43,0	42,6
14 (C)	169,7	169,8
15 (CH)	72,3	72,1
16 (CH)	78,3	78,3
17 (C)	167,0	166,9
18 (C)	110,2	110,2
19 (C)	147,2	147,2
20 (C)	144,8	144,7
21 (CH)	118,7	118,8
22 (CH)	119,4	119,3
23 (CH)	119,5	119,6
24 (CH ₃)	20,6	20,3
25 (CH ₂)	43,0	42,7
26 (CH ₂)	27,0	27,1
27 (CH ₂)	39,1	38,9
29 (C)	170,4	169,2
30 (C)	113,8	115,2
31 (C)	149,5	150,0
32 (C)	146,1	148,8
33 (CH)	118,2	114,5
34 (CH)	118,8	119,2
35 (CH)	115,6	118,1
36 (CH ₃)	-	56,2

Tabela 3: Dados de RMN de ¹³C das substâncias (**10**) e (**11**) em CDCl₃, 500 MHz. *Deslocamentos quí<u>micos obtidos indiretamente por análises HSQC e HM</u>BC.

A atribuição dos valores de deslocamento químico dos ¹H e/ou ¹³C aromáticos das substâncias 8 a 11 foi possível observando as correlações COSY¹H¹H e/ou HMBC. O padrão

de substituição de cada anel aromático foi observado no espectro de RMN de ¹H como dois duplo dupletos (J= 8,0 e 1,8) que se correlacionaram via COSY¹H¹H com um tripleto (J= 8,0). Os ¹H e ¹³C aromáticos se correlacionaram via HMBC ao longo de 2 ou 3 ligações de distância, conforme Figura 20, que mostra parte das correlações observadas para a substância (**11**). Segundo Ciche e colaboradores (2003), este padrão foi também observado para a substância fotobactina.

Figura 20: Esquema de correlações de RMN bidimensional para a substância (11). As setas com sentido único correspondem às correlações HMBC e setas com duplo sentido correspondem às correlações $COSY^{1}H^{1}H$.



Os ¹H das hidroxilas dos grupos catecol apresentaram deslocamento químico variando de 11,32 a 13,02 ppm. Esses valores podem variar em posição e intensidade dependendo de fatores como temperatura, solvente, quantidade de água presente e concentração da substância (BERGERON et al., 1983). No entanto, valores nesta faixa são característicos de hidroxilas fenólicas ligadas por meio de ligações de hidrogênio (PETERSON et al., 1980). Segundo Ong e colaboradores (1979), para a agrobactina foram observadas duas ressonâncias

o-fenólicas e uma *m*-fenólica, na proporção de 2:1:3. A primeira correspondente aos hidrogênios *o*-fenólicos que formam ligação de hidrogênio com o oxigênio carbonílico da amida do ácido diidroxibenzóico, a segunda, por sua vez, atribuída ao hidrogênio *o*-fenólico ligado ao nitrogênio ou oxigênio do anel oxazolínico e a terceira correspondente aos hidrogênios *m*-fenólicos. Tanto a agrobactina (**10**), quanto a substância (**11**) isoladas neste trabalho apresentaram três simpletos nesta região do espectro, corroborando as estruturas propostas. A agrobactin A (**8**), no entanto, apresentou 2 ressonâncias: uma para os três hidrogênios *o*-fenólicos, uma vez que eles são equivalentes devido a abertura do anel oxazolínico, e a outra correspondente aos hidrogênios *m*-fenólicos.

A determinação da conformação do anel oxazolínico para as substâncias (9), (19) e (11) e do fragmento de treonina para a substância (8) foi realizada observando-se a constante de acoplamento (*J*) entre os hidrogênio metínicos $\alpha \in \beta$, que ocupam as posições H-15 e 16, respectivamente. Ainda de acordo com Ong e colaboradores (1979), a constante de acoplamento *J* $\alpha\beta$ para agrobactina foi de 6,8 Hz, a qual se atribuiu a conformação *trans*, uma vez comparada ao valor de 10,2 Hz obtido para um modelo *cis*-oxazolínico. Assim, como os valores de *J* $\alpha\beta$ obtidos para as substâncias (8) a (11) isoladas neste trabalho variaram de 6,4 a 6,6 Hz, atribuiu-se a conformação *trans* para todas elas.

Os diferentes valores de deslocamento químico ¹H observados no fragmento de treonina da agrobactina A (8) e agrobactina (10) confirmam a presença da forma aberta e fechada com a presença do anel oxazolínico, respectivamente.

Pela análise de espectrometria de massas de alta resolução e determinação da fórmula molecular foi possível observar que a substância (11) diferia da agrobactina (10) pela presença de um carbono e dois hidrogênios. O espectro de RMN de ¹H de (11) sugeriu a presença de um grupo metoxila em 3,88 ppm. Por meio da observação das diferenças nos deslocamentos químicos dos ¹H aromáticos H-33 a 35, bem como dos ¹³C aromáticos C-30 a 35 da substância (11) em relação a (10), concluiu-se que a metoxila estava inserida neste respectivo anel aromático. A análise de RMN bidimensional HMBC apontou correlação entre a os ¹H em 3,88 ppm e o ¹³C da posição 32. Desta forma foi proposta a estrutura de (11) (Figura 19-11). É importante salientar que não se descarta a possibilidade de que esta substância ainda não descrita seja um artefato da extração com metanol, proveniente de metilação da agrobactina. No entanto, o fato da metilação ter ocorrido preferencialmente na hidroxila da posição 32 e não naquelas similares das posições 2 e 20, sugere que a reação é enzimática.

3.4.3 Avaliação do potencial biológico da substância majoritária purificada a partir da fração polar do extrato T06CENA556_Cz do cultivo misto

A substância majoritária agrobactina (**10**) foi selecionada para ensaio de atividade microbiana uma vez que apresentou uma abundancia cerca de 20 vezes maior que os demais sideróforos isolados, com um rendimento de mais de 50 mg em comparação com a média de 2,5 mg para as demais substâncias. Este rendimento ainda corresponde a cerca de 6,5 % (p/ p) em relação ao extrato bruto obtido do meio de cultura.

Agrobactina (10) inibiu o crescimento de cinco linhagens de bactérias patogênicas (Figura 21). O Quadro 4 mostra os valores para a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) desta substância e dos padrões de antibiótico, para cada linhagem de bactéria avaliada.

Observa-se que a substância isolada é bastante promissora para o uso na antibioticoterapia uma vez que apresentou CIM próxima ou, no caso de *P. mirabilis*, menor que o padrão de referência utilizado na terapêutica. No entanto, a concentração de 400 µg/ mL (concentração máxima avaliada) não apresentou ação bactericida, indicando uma ação apenas bacteriostática. A agrobactina foi previamente isolada da cultura de uma bactéria do solo *Agrobacterium tumefaciens* (ONG et al., 1979) e a agrobactina A foi obtida da hidrólise ácida da mesma (BERGERON et al., 1983). Alguns análogos destas substâncias foram sintetizados com o objetivo de verificar a capacidade dos mesmos de atuarem como carreadores de antibióticos para o interior das células de bactérias utilizando sistemas de transporte de ferro. Nestes estudos foi observado um aumento na atividade antibiótica (BUCKLEY et al., 1994; MINNICK et al., 1992). Assim, sugere-se que uma associação entre fármacos, incluindo sideróforos, seja um alternativa viável para se obter novos antibióticos mais eficientes e seletivos, ou até mesmo resgatar o uso daqueles que vem perdendo sua eficácia pelo fenômeno da resistência.

Figura 21: Placas dos ensaios de CIM para a substância agrobactina (**10**) isolada do fungo *T. atroviride* em cultivo misto com a cianobactéria *Geiltlerinema* sp CENA556. A, B, C: diluição seriada das amostras em triplicata, onde os poços de 1 a 12 correspondem à concentração amostral de 400 a $0,2 \,\mu\text{g/mL}$, com fator de diluição de 1/2. G: diluição seriada da substância padrão, de 5,9 a $0,003 \,\mu\text{g/mL}$. H: Controles positivos e negativos. Leitura: Coloração azul significa que houve inibição do crescimento bacteriano e coloração rosa indica crescimento bacteriano.



Quadro 4: Resultados da atividade antimicrobiana da substância majoritária (agrobactin) isolada do fungo *T. atroviride* T06 em cultivo misto com a linhagem de cianobactéria *Geitlerinema* sp CENA556.

Microrganismo	CIM da	CIM Padrão	CBM da	CBM do
	substância	(µg/mL)	substância	padrão
	(µg/mL)		(µg/mL)	(µg/mL)
Staphylococcus aureus				
ATCC 25923	3,1250	2,9500*	\geq 400	5,9
Staphylococcus				
saprophyticus				
ATCC 15305	3,1250	2,9500*	\geq 400	5,9
Pseudomonas				
aeruginosaATCC 27853	1,5625	0,7375**	$\geq \!\! 400$	5,9
Proteus mirabilis				
ATCC 29906	3,1250	5,9000**	$\geq \!\! 400$	≥5,9
E. coli				
ATCC 25922	3,125	0,7375**	≥400	5,9

* Penicilina G. ** Estreptomicina

3.5 Conclusões

O meio Czapek mostrou-se mais favorável para o desenvolvimento do cultivo misto entre as linhagens cianobacteriana e fúngica estudadas quando comparado ao meio sólido arroz e ao meio líquido ASNIII, apresentando uma alteração visual na coloração do meio de cultura.

A cultura mista entre o fungo endofítico *Trichoderma atroviride* (código T06) e a cianobactéria *Geitlerinema* sp CENA556 em Czapeck apresentou diferença significativa na produção de metabólitos secundários, em relação ao cultivo do fungo isolado.

O estudo da associação entre esses grupos de microrganismos para a produção de substâncias de interesse farmacológico é inédito na literatura e mostrou-se promissor para o isolamento de sideróforos com atividade antibiótica.

A agrobactina, substância majoritária isolada, demonstrou significativo potencial de inibição do crescimento de bactérias patogênicas.

REFERÊNCIAS

ABOU-HUSSEIN, D. R.; BADR, J. M.; YOUSSEF, D. T. A. Nucleoside Constituents of the Egyptian Tunicate *Eudistoma laysani*. **Natural Product Sciences**, v. 13, p. 229-233, 2007.

ALTERMANN, W.; KAZMIERCZAK, J. Archean microfossils: a reappraisal of early life on earth. **Research in Mycrobiology**, v. 154, p. 611-617, 2003.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic Local Alignment Search Tool. Journal of Molecular Biology, v. 215, p. 403-410, 1990.

AL-WATHNANI, H.; ARA, I.; TAHMAZ, R. R.; AL-DAYEL, T. H.; BAKIR, M. A. Bioactivity of natural compounds isolated from cyanobacteria and green algae against human pathogenic bacteria and yeast. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, p. 3425-3433, 2012.

ANAGNOSTIDIS, K. Geitlerinema, a new genus of oscillatorialean cyanophytes. **Plant Systematics and Evolution**, v. 164, p. 33-46, 1989.

ANDREOTE, A. P. D.; VAZ, M. G. M. V.; GENUÁRIO, D. B.; BARBIERO, L.; REZENDE-FILHO, A. T.; FIORE, M. F. Nonheterocytous cyanobacteria from Brazilian saline-alkaline lakes. **Journal of Phycology**, v. 50, p. 675-684, 2014.

ANDRIANASOLO, E. H.; GROSS, H.; GOEGER, D.; MUSAFIJA-GIRT, M.; MCPHAIL, K.; LEAL, R. M.; MOOBERRY, S. L.; GERWICK, W. H. Isolation of swinholide A and related glycosylated derivatives from two field collections of marine cyanobacteria. **Organic Letters**, v. 7, p. 1375-1378, 2005.

ANDRIANASOLO, E. H.; GOEGER, D.; GERWICK, W. H. Mitsoamide: a cytotoxic linear lipopeptide from the Madagascar marine cyanobacterium *Geitlerinema* sp. **Pure and Applied Chemistry**, v. 79, p. 593-602, 2007.

ANGELIS, S; NOVAK, A. C.; SYDNEY, E. B.; SOCCOL, V. T.; CARVALHO, J. C.; PANDEY, A.; NOSEDA, M. D.; THOLOZAN, J. L.; LORQUIN, J.; SOCCOL, C. R. Coculture of microalgae, cyanobacteria, and macromycetes for exopolysaccharides production: Process preliminary optimization and partial characterization. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, p. 1092-1106, 2012.

ANGERMAYR, S, A.; ROVIRA, A. G.; HELLINGWERF, K. J. Metabolic engineering of cyanobacteria for the synthesis of commodity products. **Trends in Biotechnology**, v. 33, p. 352-361, 2015.

ARAÚJO, L. W.; LIMA, S. O. A.; AZEVEDO, L. J.; MARCON, J.; SOBRAL, K. J.; LAVACA, T. P. Manual: isolamento de microrganismos endofíticos. 1^a Ed. Piracicaba: ESALQ, 2002.

ARIFFIN, S. A.; DAVIS, P.; RAMASAMY, K. Cytotoxic and antimicrobial activities of Malaysian marine endophytic fungi. **Botanica Marina**, v. 54, p. 95-100, 2011.

AZEVEDO, S. M. F. O.; CARMICHAEL, W. W.; JOCHIMSEN, E. M.; RINEHART, K. L.; LAU, S.; SHAW, G. R.; EAGLESHAM, G. K. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru - Brazil. **Toxicology**, v. 181, p. 441-446, 2002.

BRAKHAGE, A. A. Regulation of fungal secondary metabolism. Nature Reviews Microbiology, v. 11, p. 21-32, 2013.

BALZARINI, J.; CELEN, S.; KARLSSON, A.; GROOT, T.; VERBRUGGEN, A.; BORMANS, G. The effect of a methyl or 2-fluoroethyl substituent at the N-3 position of thymidine, 3'-fluoro-3'-deoxythymidine and 1-b-D-arabinosylthymine on their antiviral and cytostatic activity in cell culture. **Antiviral Chemistry and Chemotherapy**, v. 17, p. 17-23, 2006.

BANE, V.; LEHANE, M.; DIKSHIT, M.; O'RIORDAN, A.; FUREY, A. Tetrotodotoxin: chemistry, toxicity, source, distribution and detection. **Toxins**, v. 6, p. 693-755, 2014.

BERGERON, R. J.; STOLOWICH, N. J.; KLINE, S. J. Synthesis and Solution Dynamics of Agrobactin A. Journal of Organic Chemistry, v. 48, p. 3432-3439, 1983.

BERGMANN, W.; FEENEY, R. J. The Isolation of a New Thymine Pentoside from Sponges. **Journal of American Chemical Society**, v. 72, p. 2809-2810, 1950.

BERGMANN, W.; FEENEY, R. J. Contributions to the study of marine products. XXXII. The nucleosides of sponges. I. Journal of Organic Chemistry, v. 16, p. 981-987, 1951.

BERGMANN, W.; Burke. D. C. Contributions to the study of marine products. XXXIX. The nucleosides of sponges. III. Spongothymidine and Spongoudine. Journal of Organic Chemistry, v. 20, p. 1501-1507, 1955.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; KEYZERS, R. A.; MUNRO, M. H. G.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural Products Reports**, v. 33, p. 382-431, 2016.

BOURGUET-KONDRACKI, M. L.; KORNPROBST, J. M. Promising marine molecules in pharmacology. **Outstanding Marine Molecules**, 245-264, 2014.

BRANCO, L. H. Z.; MOURA, A. N.; SILVA, A. C.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C. Biodiversity and biogeographic considerations of Cyanobacteria in a mangrove area of the State of Pernambuco, Brazil. Acta Botanica Brasilica, v. 17, p. 585-596, 2003.

BRANCO, L. H. Z.; SANT'ANNA, C. L.; AZEVEDO, M. T. P.; SORMUS, L. Cyanophyte flora from Cardoso Island mangroves, São Paulo State, Brazil. 2. Oscillatoriales. Algological Studies - Archiv für Hydrobiologie, v. 84, p. 39-52, 1997.

BRITO, A.; RAMOS, V.; SEABRA, R.; SANTOS, A.; SANTOS, C. L.; LOPO, M.; FERREIRA, S.; MARTINS, A.; MOTA, R.; FRAZÃO, B.; MARTINS, R.; VASCONCELOS, V.; TAMAGNINI, P. Culture-dependent characterization of cyanobacterial diversity in the intertidal zones of the Portuguese coast: a polyphasic study. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 35, p. 110-119, 2012.

BROX, L. W.; POLLOCK, E.; BELCH, A. Adenosine and deoxyadenosine toxicity in colony assay systems for human T-lymphocytes, B-lymphocytes, and granulocytes. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 9, p. 49-52, 1982.

BUCKLEY, G. M.; PATTENDEN, G.; WHITING, D. A. New synthetic probes of the iron transport system of Paracoccus denitrificans. **Tetrahedron**, v. 50, p. 11781-11792, 1994.

BUSS, J. L.; TORTI, F. M.; TORTI, S. V. The role of iron chelation in cancer therapy. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 1021-1034, 2003.

BUTLER, A. Marine siderophores and microbial iron mobilization. **BioMetals**, v. 18, p. 369-374, 2005.

BUTLER, A.; THEISEN, R. M. Iron(III)-siderophore coordination chemistry: Reactivity of marine siderophores. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 254, p. 288-296, 2010.

CAICEDO, N. H.; HEYDUCK-SÖLLER, B.; FISCHER, U.; THÖMING, J. Bioproduction of antimicrobial-compounds by using marinefilamentous cyanobacterium cultivation. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, p. 811-818, 2011.

CAICEDO, N. H. KUMIRSKA, J.; NEUMANN, J.; STOLTE, S.; THÖMING, J. Detection of Bioactive Exometabolites Produced by the Filamentous Marine Cyanobacterium *Geitlerinema* sp. **Marine Biotechnology**, v. 14, p. 436-445, 2012.

CASTENHOLZ, R. W. Culturing methods for cyanobacteria. **Methods in Enzymology**, v. 167, 68-93, 1988.

CASTENHOLZ, R. W.; RIPPKA, R.; HERDAMAN, M. The Cyanobacteria: subsection 3. In: Boone, D.R.; Castenholz, R.W. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. New York: Springer, 2001. p. 493-514.

CATALIOTO, R. M., FESTA, C., TRIOLO, A., ALTAMURA, M., MAGGI, C. A. & GIULIANI, S. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and drug metabolism. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 98, p. 714-727, 2009.

CHALCRAFT, K. R.; LEE, R.; MILLS, S.; BRITZ-MCKIBBIN. Virtual quantification of metabolites by capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry: predicting ionization efficiency without chemical standards. **Analytical Chemistry**, v. 81, p. 2506-2515, 2009.

CHEN, P.; JEANNOTTE, R.; WEIMER, B. C. Exploring bacterial epigenomics in the nextgeneration sequencing era: a new approach for an emerging frontier. **Trends in Microbiology**, v. 22, p. 292-300, 2014.

CHET, I.; INBAR, J. Biological control of fungal pathogens. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 48, p. 37-43, 1994.

CHEUNG, R. C. F.; NG, T. B.; WONG, J. H. Marine Peptides: Bioactivities and Applications. **Marine Drugs**, v. 13, p. 4006-4043, 2015.

CHEUNG, R. C. F.; NG, T. B.; WONG, J. H.; CHEN, Y.; CHAN, W. Y. Marine natural products with anti-inflammatory activity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 1645-1666, 2016.

CHOI, H.; MEVERS, E.; BYRUM, T.; VALERIOTE, F. A.; GERWICK, W. H. Lyngbyabellins K–N from Two Palmyra Atoll Collections of the Marine Cyanobacterium Moorea bouillonii. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2012, p. 5141-5150, 2012a.

CHOI, H.; MASCUCH, S. J.; VILLA, F. A.; BYRUM, T.; TEASDALE, M. E.; SMITH, J. E.; PRESKITT, L. B.; ROWLEY, D. C.; GERWICK, L.; GERWICK, W. H. Honaucins A-C, potent inhibitors of inflammation and bacterial quorum sensing: synthetic derivatives and structure-activity relationships. **Chemistry & Biology**, v. 19, p. 589-598, 2012b.

CHLIPALA, G. E.; MO, S.; ORJALA, J. Chemodiversity in freshwater and terrestrial cyanobacteria - A source for drug discovery. **Current Drug Targets**, v. 12, p. 1654-1673, 2011.

CICHE, T. A.; BLACKBURN, M.; CARNEY, J. R.; ENSIGN, J. C. Photobactin: a Catechol Siderophore Produced by *Photorhabdus luminescens*, an Entomopathogen Mutually Associated with *Heterorhabditis bacteriophora* NC1 Nematodes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 4706-4713, 2003.

CIUFFREDA, P.; CASATI, S.; MANZOCCHI, A. Spectral assignments and reference data: Complete 1H and 13C NMR spectral assignment of α - and β -adenosine, 2'-deoxyadenosine and their acetate derivatives. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 45, p. 781-784, 2007.

CLIFFORD, R. M.; BAO, Y.; BENZ, N. J.; ZHANG, S. Comparasion of the sensitivity of evaporative universal detectors and LC/MS in the HILIC and the reversed-phase HPLC modes. Journal of Chromatography B, v. 877, p. 4133-4139, 2009.

COSTA, M.; RODRIGUES, J. C.; FERNANDES, M. H.; BARROS, P.; VASCONCELOS, V.; MARTINS, R. Marine Cyanobacteria Compounds with Anticancer Properties: A Review on the Implication of Apoptosis. **Marine Drugs**, v. 10, p. 2181-2207, 2012.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug lead. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 3670-3695, 2013.

DABAS, P.; TRIPATHI, S.; CHAUHAN, S.; MALIK, I.; KUMAR, N.; KUMARI, S.; KUMARI, R.; BHATNAGAR, S.; DEEPALI. Cyanobacteria - an unexplored source for biomolecules: a review. Advanced Science, Engineering and Medicine, v. 6, p. 921-930, 2014.

DANIEL, J. F. S.; RODRIGUES FILHO, E. Peptaibols of *Trichoderma*. Natural Products Reports, v. 24, p. 1128-1141, 2007.

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

DAVOLL, J.; LOWY, B. A. A new synthesis of purine nucleosides: The synthesis of adenosine, guanosine and 2,6-diamino-9- β -D-ribofuranosylpurine. Journal of American Chemistry Society, v. 73, p. 1650-1655, 1951.

DITTMANN, E.; GUGGER, M.; SIVONEN, K.; FEWER, D. P. Natural Product Biosynthetic Diversity and Comparative Genomics of the Cyanobacteria. **Trends in Microbiology**, v. 23, p. 642-652, 2015.

DORONINA, S. O.; TOKI, B. E.; TORGOV, M. Y.; MENDELSOHN, B. A.; CERVENY, C. G.; CHACE, D. F.; et al. Development of potent monoclonal antibody auristatin conjugates for cancer therapy. **Natural Biotechnology**, v. 21, p. 778-784, 2003.

DORONINA, S. O.; BOVEE, T. D.; Meyer, D. W.; Miyamoto, J. B.; Anderson, M. E.; MORRIS-TILDEN, C. A.; et al. Novel peptide linkers for highly potent antibody-auristatin conjugate. **Bioconjugate Chemistry**, v. 19, p. 1960-3, 2008.

DRUZHININA, I. S.; KOPCHINSKIY, A. G.; KUBICEK, C. P. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. **Mycoscience**, v. 47, p. 55-64, 2006.

DUAN, B.; WANG, L.; DAÍ, X.; HUANG, L.; YANG, M.; CHEN, S. Identification and quantitative analysis of nucleosides and nucleobases in aqueous extracts of *Fritillaria cirrhosa* D. Don. Using HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS. **Analytical Letters**, v. 44, p. 2491-2502, 2011.

DUCAT, D. C.; WAY, J. C.; SILVER, P. A. Engineering cyanobacteria to generate high-value product. **Trends in Biotechnology**, v. 29, p. 95-103, 2011.

ENGENE, N.; COATES, R. C.; GERWICK, W. H. 16S rRNA gene heterogeneity in the filamentous marine cyanobacterial genus *Lyngbya*. **Journal of Phycology**, v. 46, p. 591-601, 2010.

ENGENE, N.; ROTTACKER E. C.; CHOI, H.; BYRUM, T.; KAŠTOVSKÝ, J. H.; KOMÁREK, J.; GERWICK, W. H. *Moorea producens* gen. nov., sp. nov. and *Moorea bouillonii* comb. nov., tropical marine cyanobacteria rich in bioactive secondary metabolites. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, p. 1172-1179, 2012.

ENGENE, N.; GUNASEKERA, S. P.; GERWICK, W. H.; PAULA, V. J. Phylogenetic Inferences Reveal a Large Extent of Novel Biodiversity in Chemically Rich Tropical Marine Cyanobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, p. 1882-1888, 2013a.

ENGENE, N; PAUL, V. J.; BYRUM, T.; GERWICK, W. H.; THOR, A.; ELLISMAN, M. Five chemically rich species of tropical marine cyanobacteria of the genus *Okeania* gen. nov. (Oscillatoriales, Cyanoprokaryota). **Journal of Phycology**, v. 49, p. 1095-1106, 2013b.

ENGENE, N.; TRONHOLM, A.; SALVADOR-REYES, L.A.; LUESCH, H.; PAUL, V.J. *Caldora penicillata* gen nov., sp. nov. (Cyanobacteria), a pantropical marine species with biomedical relevance. **Journal of Phycology**, v. 51, p. 670-681, 2015.

FAZARY, A. E; AL-SHIHRIA, A. S.; ALFAIFIC, M. Y.; SALEHC, K. A.; ALSHEHRIC, M. A.; ELBEHAIRIB, S. E. I.; JU, Y. Microbial production of four biodegradable siderophores under submerged fermentation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 88, p. 527-541, 2016.

FELCZYKOWSKA, A.; BLOCH, S. K.; NEJMAN-FALENCZYK, B.; BARANSKA, S. Metagenomic approach in the investigation of new bioactive compounds in the marine environment. Acta Bichimica Polonica, v. 59, p. 501-505, 2012.

FELÍCIO, R. Produtos naturais marinhos: identificação de metabólitos fenólicos halogenados na macroalga *Bostrychia tenella* (Rodhomelaceae, Rhodophyta e potencial biológico de microrganismos endofíticos associados. 2010. 207 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

FERRÃO-FILHO, A. S.; SUZUKI, B. K. Cyanotoxins: Bioaccumulation and effects on aquatic animals. **Marine Drugs**, v. 9, p. 2729-2772, 2011.

FIORE, M. F.; MOON, D. H.; TSAI, S. M.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Miniprep DNA Isolation from Unicellular and Filamentous Cyanobacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 39, p. 159-169, 2000.

FIORE, M. F.; SANT'ANNA, C. L.; AZEVEDO, M. T. P.; KOMÁREK, J.; KAŠTOVSKÝ, J.; SULEK, J.; LORENZI, A. S. The cyanobacterial genus *Brasilonema*, gen. nov., a molecular and phenotypic evaluation. **Journal of Phycology**, v. 43, p. 789-798, 2007.

FLEWELLING, A. J.; CURRIE, J.; GRAY, C. A.; JOHNSON, J. A. Endophytes from marine macroalgae: Promising sources of novel natural products. **Current Science**, v. 109, p. 88-111, 2015.

FREITAS, J. C. Biomedical importance of marine natural products. **Ciência e Cultura**, v. 42, p. 20-24, 1990.

GALMARINI, C. M.; D'INCALCI, M.; ALLAVENA, P. Trabectedin and plitidepsin: drugs from the sea that strike the tumor microenvironment. **Marine Drugs**, v. 12, p. 719-733, 2014.

GAO, X.; SUN, T.; PEI, G.; CHEN, L.; ZHANG, W. Cyanobacterial chassis engineering for enhancing production of biofuels and chemicals. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 3401-3413, 2016.

GENUÁRIO, D.B.; CORRÊA, D.M.; KOMÁREK, J.; FIORE, M.F. Characterization of freshwater benthic biofilm-forming *Hydrocoryne* isolates from Antarctica. **Journal of Phycology**, v. 49, p. 1142-1153, 2013.

GENUÁRIO, D. B.; VAZ, M. G. M. V.; HENTSCHKE, G. S.; SANT'ANNA, C. L.; FIORE, M. F. Halotia gen. nov., a phylogenetically and physiologically coherent cyanobacterial genus isolated from marine coastal environments. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, p. 663-675, 2015.

GERWICK, W. H.; MOORE, B. S. Lessons from the Past and Charting the Future of Marine Natural Products Drug Discovery and Chemical Biology. **Chemistry & Biology**, v. 19, p. 85-98, 2012.

GERWICK, W. H.; FENNER, A. M. Drug discovery from marine microbes. Microbial ecology, v. 65, p. 800-806, 2013.

GHISALBERTI, E. L.; HOCKLESS, D. C. R.; ROWLAND, C.; WHITE, A. H. Harziandione, a new class of diterpene from *Trichoderma harzianum*. Journal of Natural **Products**, v. 55, p. 1690-1694, 1992.

GOGINENI, V.; SCHINAZI, R. F.; HAMANN, M. T. Role of marine natural products in the genesis of antiviral agents. **Chemical Reviews**, v. 115, p. 9655-9706, 2015.

GRIBBLE, G. W. Biological Activity of Recently Discovered Halogenated Marine Natural Products. **Marine Drugs**, v.13, p. 4044-4136, 2015.

GUPTA, D. K.; KAUR, P.; LEONG, S. T.; TAN, L. T.; PRINSEP, M. R.; CHU, J. J. H. Marine Drugs, v. 12, p. 115-127, 2014.

HABBU, P.; WARAD, V.; SHASTRI, R.; MADAGUNDI, S.; KULKARNI, V. H. Antimicrobial metabolites from marine microorganisms. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 14, p.101-116, 2016.

HE, P.; HUANG, Z.; WU, G.; CHU, Z.; SHI, Q.; HUANG, J. Resolution of DLphenylalanine by papain and immobilized papain. **Zhongguo Shengwu Huaxue Yu Fenzi Shengwu Xuebao**, v. 25, p. 23-29, 2009.

HEIMANN, K. Novel approaches to microalgal and cyanobacterial cultivation for bioenergy and biofuel production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 38, p. 183-189, 2016.

HISAMOTO, M.; KIKUZAKI, H.; OHIGASHI, H.; NAKATANI, N. Antioxidant compounds from leaves of *Peucedanum japonicum* Thunb. **Journal of Food Chemistry**, v. 51, p. 5255-5261, 2003.

HOFFMANN, L.; KOMÁREK, J.; KAŠTOVSKÝ, J. System of cyanoprokaryotes (Cyanobacteria): state in 2004. Algological Studies, v. 117, p. 95-115, 2005.

HOLINSWORTH, B.; MARTIN, J. D. Siderophore production by marine-derived fungi. **BioMetals**, v. 22, p. 625-632, 2009.

HONG, J. H.; JANG, S.; HEO, Y. M.; MIN, M.; LEE, H.; LEE, Y. M.; LEE, H.; KIM, J. J. Investigation of Marine-Derived Fungal Diversity and Their Exploitable Biological Activities. **Marine Drugs**, v. 13, p. 4137-4155, 2015.

HOU, X. M.; XU, R. F.; GU, Y. C.; WANG, c. Y.; SHAO, C. L. Biological and Chemical Diversity of Coral-Derived Microorganisms. **Current Medicinal Chemistry**, v. 22, p. 3707-3762, 2015.

HU, G.; YANG, F. Biological Activities of Nucleosides and Their Analogues in Dietary Foods. **Chemical Rapid Communications**, v. 2, p. 22-28, 2014.

HUANG, Y.; JIANG, Y.; WANG, H.; WANG, J.; SHIN, M. C.; BYUN, Y.; HE, H.; LIANG, Y.; YANG, V. C. Curb challenges of the "Trojan Horse" approach: smart strategies in achieving effective yet safe cell-penetrating peptide-based drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p. 1299-1315, 2013.

HUANG, R. M.; CHEN, Y.; ZENG, Z.; GAO, c.; SU, X.; PENG, Y. Marine nucleosides: Structure, bioactivity, synthesis and biosynthesis. **Marine Drugs**, v. 12, p. 5817-5838, 2014.

HUSSIEN, T. A.; MOHAMED, T. A. The Bioactive Natural Products and Biological Activities of the Red Sea Soft Coral Sarcophyton: A Review. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 6, p. 1301-1319, 2015.

INUZUKA, T.; YAMAMOTO, K.; IWASAKI, A.; OHNO, O.; SUENAGA, K.; KAWAZOE, Y.; UEMURA, D. **Tetrahedron Letters**, v. 55, p. 6711-6714, 2014.

ISHIKAWA, T.; KONDO, K.; KITAJIMA, J. Water-soluble constituents of Coriander. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, p. 32-39, 2003.

ITO, A.; Kohira, N.; Bouchillon, S. K.; West, J.; Rittenhouse, S.; Sader, H. S.; Rhomberg, P. R.; Jones, R. N.; Yoshizawa, H.; Nakamura, R.; Tsuji, M.; Yamano, Y. In vitro antimicrobial activity of S-649266, a catechol-substituted siderophore cephalosporin, when tested against non-fermenting Gram-negative bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, p. 670-677, 2016.

IWASAKI, A.; SUMIMOTO, S.; OHNO, O.; SUDA, S.; SUENAGA, K. Kurahamide, a cyclic depsipeptide analog of dolastatin 13 from a marine cyanobacterial assemblage of *Lyngbya* sp. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 87, p. 609-613, 2014.

JACOBSON, K. A.; JARVIS, M .F.; WILLIAMS, M. Purine and pyrimidine (P2) receptors as drug targets. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 4057-4093, 2002.

JAMISON, M. T.; BODDY, C. N.; MOLINSKI, T. F. Salvadenosine, a 5'-deoxy-5'-(methylthio) nucleoside from the Bahamian tunicate *Didemnum* sp. **Jounal of Organic Chemistry**, v. 79, p. 9992-9997, 2014.

JEYADEVI, R.; SIVASUDH, T.; ILAVARASI, A.; THAJUDDIN, N. Chemical Constituents and Antimicrobial Activity of Indian Green Leafy Vegetable Cardiospermum halicacabum. **Indian Journal of Microbiology**, v. 53, p. 208-213, 2013.

JONES, A. C.; OTTILIE, S.; EUSTÁQUIO, A, S.; EDWARDS, D. J.; GERWICK, L.; MOORE, B. S.; GERWICK, W. H. Evaluation of *Streptomyces coelicolor* A3(2) as a heterologous expression host for the cyanobacterial protein kinase C activator lyngbyatoxin A. **FEBS Journal**, v. 279, p. 1243-1251, 2012.

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, p. 1622-1635, 2011.

KJER, J.; DEBBAB, A.; ALY, A. H.; PROKSCH, P. Methods for isolation of marine-derived endophytic fungi and their bioactive secondary products. **Nature Protocols**, v. 5, p. 479-490, 2010.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Modern Approach to the Classification System of Cyanophytes 4. Noazstocales. Algological Studies - Archiv für Hydrobiologie, v. 56, p. 247-345, 1989.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokaryota, 1. Teil: Chroococcales. In: Ettl, H., Gärtner, G., Heynig, H., Mollenhauer, D. (Eds.). Süsswasserflora von Mitteleuropa, Gustav Fisher, Stuttgart, pp. 1-548. (1999)

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokaryota. 2.Teil: Oscillatoriales. In: Büdel, B., Krienitz, L., Gärtner, G., Schagerl, M. (Eds.) Süsswasserflora von Mitteleuropa, Elsevier, Munique, pp. 1-759. (2005)

KOMÁREK, J. Cyanobacterial taxonomy: current problems and prospects for the integration of traditional and molecular approaches. **Algae**, v. 21, p. 349-375, 2006.

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

KOSKI, R. R. Omega-3-acid ethyl esters (Lovaza) for severe hypertriglyceridemia. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 33, p. 271-303, 2008.

HONEK, J.; EFFERTH, T. Marine Compounds. In: Kuete, V.; Efferth, T (Eds). **Biodiversity**, **Natural Products and Cancer Treatment**. Singapore: World Scientific, 2014. Cap. 6, p. 209-250.

KUMAR, s.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA 3: Integrated software for molecular evolutionary genetic analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, v. 5, p. 150-153, 2004.

LANE, A. L.; MOORE, B. S. A sea of biosynthesis: marine natural products meet the molecular age. **Natural Products Reports**, v. 28, p. 411-428, 2011.

LI, L.; DENG, Z.; LI, J., FU, H.; LIN, W. Chemical constituints from Chinese marine sponge *Cinachyrella australiensis*. **Beijing Da Xue Xue Bao**, v. 36, p. 12-17. 2004.

LI, R. W. S.; SETO, S. W.; AU, A. L. S.; KWAN, Y. W.; CHAN, S. W.; LEE, S. M.; TSE, C. M.; LEUNG, G. P. H. Inhibitory effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on adenosine transport in vascular smooth muscle cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 612, p. 15-20, 2009.

LI, K.; CHUNG-DAVIDSON, Y. W.; BUSSY, U.; LI, W. Recent Advances and Applications of Experimental Technologies in Marine Natural Product Research. **Marine Drugs**, v. 13, p. 2694-2713, 2015.

LIN, K.; CHIANG, L.; WU, C.; CHEN, S.; YU, C. Synthesis of 5-radioiodoarabinosyl uridine analog for probing the HSV-1 thymidine kinase gene. Journal of the Chinese Chemistry Society, v. 54, p. 563-568, 2007.

LIU, R.; YE, Y.; QIANG, L.; LIAO, X.; ZHAO, Y. The fragmentation pathway of the nucleosides under the electrospray ionization multi-stage mass spectrometry. Life Science Journal, v. 5, p. 37-40, 2008.

LIU, K. K. C.; SAKYA, S. M.; O'DONNELL, C. J.; FLICK, A. C.; DING, H. X. Synthetic approaches to the 2010 new drugs. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 1155-1174, 2012.

LIU, H.; Li, X.; LIU, Y.; ZHANG, P.; WANG, J.; WANG, B. Chermesins A–D: Meroterpenoids with a Drimane-Type Spirosesquiterpene Skeleton from the Marine Algal-Derived Endophytic Fungus Penicillium chermesinum EN-480. Journal of Natural **Products**, v. 79, p. 806-811, 2016.

LOSSE, G., HEBEL, H. J. & KASTNER, C. Resolution of amino acid amide and hydrazide racemates. **Journal für Praktische Chemie**, v. 8, p.339-352, 1959.

LOVEJOY, D. B.; RICHARDSON, D. R. Iron chelators as anti-neoplastic agents: current developments and promise of the PIH class of chelators. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 1035-1049, 2003.

LU, X.; TIAN, L.; CHEN, G.; XU, Y.; WANG, H. F.; LI, Z. Q.; PEI, Y. H. Three new compounds from the marine-derived fungus *Trichoderma atroviride* G20-12. Journal of Asian Natural Products Research, v. 14, p. 647-651, 2012.

MARCHENKO, S. I.; TRUKHACHEVA, T. V.; GUBINA, L. P.; MOISEEV, D. V.; PETROV, P. T.; ZHEBENTYAEV, A. I. Structure of chemical compounds, methods of analysis and process control: HPLC-based quality control of cytarabine preparations. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 20, p. 678-682. 2006.

MARUMOTO, R.; HONJO, M. Shynthesis of O2,2'-cyclouridine. Takeda Kenkyusho Nenpo, v. 26, p. 21-23, 1967.

MAYER, A. M.; GLASER, K. B.; CUEVAS, C.; JACOBS, R. S.; KEM, W.; LITTLE, R. D.; et al. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 31, p. 255-265, 2010.

MCCONNELL, O.; LONGLEY, R. E.; KOEHN, F. E. The discovery of natural products with therapeutical potential. **Biotechnology**, v. 26, p. 109-174, 1994.

MCGIVERN, J. G. Ziconotide: a review of its pharmacology and use in the treatment of pain. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 3, p. 69-85, 2007.

MENAHEM, T.; MASTAI, Y. Chiral soluble polymers and microspheres for enantioselective crystallization. **Journal of Polymer Science**, v. 44, p. 3009-3017, 2006.

MEVERS, E.; MATAINAHO, T.; DI MARZO, M. A. V.; GERWICK, W. H. Mooreamide A: a cannabinomimetic lipid from the marine cyanobacterium *Moorea bouillonii*. **Lipids**, v. 49, p. 1127-1132, 2014.

MIAO, F. P.; LIANG, X. R.; YIN, X. L.; WANG, G.; JI, N. Y. Absolute configurations of unique harziane diterpenes from *Trichoderma* species. **Organic Letters**, v. 14, p. 3815-3817, 2012.

MIETHKE, M.; MARAHIEL, M. A. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, p. 413-451, 2007.

MIKHAILOPULO, I. A.; MIROSHNIKOV, A. I. Biologically important nucleosides: modern trends in biotechnology and application. **Mendeleev Communications**, v. 21, p. 57-68, 2011.

MINNICK, A. A.; McKEE, J. A.; DOLENCE, E. K.; MILLER, M. J. Iron transport-mediated antibacterial activity of and development of resistance to hydroxamate and catechol siderophore-carbacephalosporin conjugates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, p. 840-850, 1992.

MISHRA, A.; TANDON, R.; KESARWANI, S.; SINGH, R.; TIWARI, G. L. Emerging applications of cyanobacterial ultraviolet protecting compound scytonemin. Journal of Applied Phycology, v. 27, p. 1045-1051, 2015.

MITSIADES, C. S.; OCIO, E. M.; PANDIELLA, A.; MAISO, P.; GAJATE, C.; GARAYOA, M.; et al. Aplidin, a marine organism-derived compound with potent antimyeloma activity in vitro and in vivo. **Cancer Research**, v. 68, p. 5216-5225, 2008.

MITSUYA, H.; WEINHOLD, K. J.; FURMAN, P. A.; ST CLAIR, M. H.; LEHRMAN, S. N.; GALLO, R. C.; et al. 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 82, p. 7096-7100, 1985.

MOGHADAMTOUSI, S. Z.; NIKZAD, S.; KADIR, H. A.; ABUBAKAR, S.; ZANDI, K. Potential antiviral agents from marine fungi: An overview. **Marine Drugs**, v. 13, p. 4520-4538, 2015.

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

MOLINSKI, T. F.; MORINAKA, B. I. Integrated approaches to the configurational assignment of marine natural products. **Tetrahedron**, v. 68, p. 9307-9343, 2012.

MUKHERJEE, M.; MUKHERJEE,1 P. K.; HORWITZ, B. A.; ZACHOW, C.; BERG, G.; ZEILINGER, S. Trichoderma–Plant–Pathogen Interactions: Advances in Genetics of Biological Control. **Indian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 522–529, 2012.

MUNRO, M. H. G.; BLUNT, J. W.; DUMDEI, E. J.; HICKFORD, S. J. H.; LILL, R. E.; LI, S. X.; BATTERSHILL, C. N.; DUCKWORTH, A. R. The discovery and development of

marine compounds with pharmaceutical potential. Jornal of Biotechnology, v.70, p. 15–25, 1999.

MYERS, J. L.; SEKAR, R.; RICHARDSON, L. L. Molecular Detection and Ecological Significance of the Cyanobacterial Genera *Geitlerinema* and *Leptolyngbya* in Black Band Disease of Corals. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 5173-5182, 2007.

NAGOBA, B.; VEDPATHAK, D. Medical applications of siderophores. European Jornal of Geneneral Medicine, v. 8, p. 229-235, 2011.

NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard 6a. Ed. NCCLS documents: Wayne. 2003.

NEILANDS, J. B. Siderophores – structure and function of microbial iron transport compounds. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 26723-26726, 1995.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. Journal of Natural Products, v. 79, p. 629-661, 2016.

NIEDERMEYER, T. H. J. Anti-infective Natural Products from Cyanobacteria. **Planta** Medica, v. 81, p. 1309-1325, 2015.

NISA, H. KAMILI, A. N.; NAWCHOO, I. A.; SHAFI, S.; SHAMEEM, N.; BANDH, S. A. Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: A review. **Microbial Pathogenesis**, v. 82, p. 50-59, 2015.

NOGUEIRA, N. M. C.; FERREIRA-CORREIA, M. M. Cyanophyceae; Cyanobacteria in red mangrove forest at Mosquitos and Coqueiros estuaries, São Luís, State of Maranhão, Brazil. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 61, p. 347-356, 2001.

NUNNERY, J. K.; MEVERS, E.; GERWICK, W. H. Biologically active secondary metabolites from marine cianobactéria. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, p. 1-7, 2010.

NÚÑEZ-PONS, L.; AVILA, C. Natural products mediating ecological interactions in Antarctic benthic communities: a mini-review of the known molecules. **Natural Products Reports**, v. 32, p. 1114-1130, 2015.

OH, S. U.; LEE, S. J.; KIM, J. H.; YOO, I. D. Structural elucidation of new antibiotic peptides, atroviridins A, B and C from *Trichoderma atroviride*. **Tetrahedron Letters**, v. 41, p. 61-64, 2000.

OLA, A. R. B.; THOMY, D.; LAI, D.; BRÖTZ-OESTERHELT, H.; PROKSCH, P. Inducing secondary metabolite production by the endophytic fungus Fusarium tricinctum through coculture with *Bacillus subtilis*. Journal of Natural Products, v. 76, p. 2094-2099, 2013.

OLIVEIRA, A. L. L.; FELÍCIO, R.; DEBONSI, H. M. Marine natural products: chemical and biological potential of seaweeds and their endophytic fungi. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, p. 1-15, 2012.

ONG, S. A.; PETERSON, T.; NEILANDS, J. B. Agrobactin, a Siderophore from Agrobacterium tumefaciens. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 254, p. 1860-1865, 1979.

PANIZEL, I.; YARDEN, O.; ILAN, M.; CARMELI, S. Eight new peptaibols from spongeassociated *Trichoderma atroviride*. **Marine Drugs**, v. 11, p. 4937-4960, 2013.

PEREIRA, A. R.; CAO, Z.; ENGENE, N.; SORIA-MERCADO, I. E.; MURRAY, T. F.; GERWICK, W. H. Palmyrolide A, an Unusually Stabilized Neuroactive Macrolide from Palmyra Atoll Cyanobacteria. **Organic Letters**, v. 12, p. 4490-4493, 2010.

PEREIRA, S. B.; MOTA, R.; SANTOS, C. L.; DE PHILIPPIS, R.; TAMAGNINI, P. Assembly and export of extracellular polymeric substances (EPS) in cyanobacteria. A phylogenomic approach. Advances in Botanical Research, v. 65, p. 235-279, 2013.

PÉREZ-VICTORIA, I.; MARTÍN, J.; REYES, F. Combined LC/UV/MS and NMR Strategies for the Dereplication of Marine Natural Products. **Planta Medica**, 2016.

PERKERSON, R. B.; JOHANSEN, J. R.; KOVÁCIK, L.; BRAND, J.; KAŠTOVSKÝ, J.; CASAMATTA, D. A. A unique Pseudanabaenalean (Cyanobacteria) genus *Nodosolinea* gen. nov. based on morphological and molecular data. **Journal of Phycology**, v. 47, p. 1397-1412, 2011.

PETERSON, T.; FALK, K.; LEONG, S. A.; KLEIN, M. P.; NEILAND, J. B. Structure and behavior of spermidine siderophores. **Journal of the American Chemical Society**, v. 102, p. 7715-7718, 1980.

PIEL, J. Metabolites from symbiotic bacteria. Natural Products Reports, v. 26, p. 338-362, 2009.

PIETRANGELO, A. Mechanism of iron toxicity. In: Hershko C (ed). **Iron chelation theraphy**. 1 Ed. New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2002. vol. 509, p. 19-43.

PRAKASH, V. Endophytic fungi as resource of bioactive compounds. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 6, p. 887-898, 2015.

RANGEL, M.; MARTINS, J. C. G.; GARCIA, A. N.; CONSERVA, G. A. A.; COSTA-NEVES, A.; SANT'ANNA, C. L.; CARVALHO, L. R. Analysis of the Toxicity and Histopathology Induced by the Oral Administration of *Pseudanabaena galeata* and *Geitlerinema splendidum* (Cyanobacteria) Extracts to Mice. **Marine Drugs**, v. 12, p. 508-524, 2014.

RANGEL, M.; FALKENBERG, M. An overview of the marine natural products in clinical trials and on the market. **Journal of Coastal Life Medicine**, v. 3, p. 421-428, 2015.

RASMUSSEN, B.; FLETCHER, I. R.; BROCKS, J. J.; KILBURN, M. R. Reassessing the first appearance of eukaryotes and cyanobacteria. **Nature**, v. 455, p. 1101-1104, 2008.

RASTOGI, R. P.; SONANI, R. R.; MADAMWAR, D. Cyanobacterial Sunscreen Scytonemin: Role in Photoprotection and Biomedical Research. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 176, p. 1551-1563, 2015.

RATNAYAKE, N.; MANATUNGE, J.; HAPUARACHCHI, D. P. Dealing with algal toxins and dissolved organics in drinking water. **Journal of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste**, v. 16, p. 118-124, 2012.

REZA, V. R. M.; ABBAS, H. Cytotoxicity and antimicrobial activity of harman alkaloids. **Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 2, p. 677-680, 2007.

RIGONATO, J.; GAMA, W. A.; ALVARENGA, D. O.; BRANCO, L. H.; BRANDINI, F. P.; GENUÁRIO, D. B; FIORE, M. F. *Aliterella atlantica* gen. nov., sp. nov. and *Aliterella antarctica* sp. nov., novel members of coccoid cyanobacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2016.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; STANIER, R. Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. Journal of General Microbiology, v. 111, p. 1-61, 1979.

ROLDÁN, M.; RAMÍREZ, M.; DEL CAMPO, J.; HERNÁNDEZ-MARINÉ, M.; KOMÁREK, J. *Chalicogloea cavernicola* gen. nov., sp. nov. (Chroococcales, Cyanobacteria), from low-light aerophytic environments: combined molecular, phenotypic and ecological criteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 2326-2333, 2013.

SAFARJALANI, O. N.; ZHOU, X. J.; RAIS, R. H.; SHI, J.; SCHINAZI, R. F.; NAGUIB, F. N. M.; MAHMOND, H. K. 5-(Phenylthio)acyclouridine: a powerful enhancer of oral uridine bioavailability: relevance to chemotherapy with 5-fluorouracil and other uridine rescue regimens. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 55, p. 541-551, 2005.

SAHA, M.; Sarkar, S.; Sarkar, B.; Sharma, B. K.; Bhattacharjee, S.; Tribedi, P. Microbial siderophores and their potential applications: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, p. 3984-3999, 2016.

SALVADOR-REYES, L. A.; LUESCH, H. Biological targets and mechanisms of action of natural products from marine cyanobacteria. Natural Products Reports, v. 32, p. 478-503, 2015.

SANT'ANNA, C. L.; AZEVEDO, M. T. P.; AGUJARO, L. F.; CARVALHO, M. C.; CARVALHO, L. R.; SOUZA, R. C. R. Manual ilustrado para identificação e contagem de cianobactérias planctônicas de águas continentais brasileiras. Rio de Janeiro: **Interciência**, 2006.

SANTOS, C. A.; REIS, A. Microalgal symbiosis in biotechnology. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 98, p. 5839-5846, 2014.

SANTOS, S. A. O.; VILELA, C.; FREIRE, C. R. S.; ABREU, M. H.; ROCHA, S. M.; SILVESTRE, A. J. D. Chlorophyta and Rhodophyta macroalgae: A source of health promoting phytochemicals. **Food Chemistry**, v. 183, p. 122-128, 2015.

SANTOYO, S.; JAIME, L.; PLAZA, M.; HERRERO, M.; RODRIGUEZ-MEIZOSO, I.; IBAÑEZ, E.; REGLERO, G. Antiviral compounds obtained from microalgae commonly used as carotenoid sources. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, p. 731-741, 2012.

SATO, Y. Structure and Function of a Novel Class of High Mannose-binding Proteins with Anti-viral or Anti-tumor Activity. **Yakugaku Zasshi**, v. 135, p. 1281-1289, 2015.

SGARRELLA, F.; FRASSETTO, L.; ALLEGRINI, S.; CAMICI, M.; CARTA, M. C.; FADDA, P.; TOZZI, M. G.; IPATA, P. L. Caracterization of the adenine nucleoside specific phosphorylase of *Bacillus cereus*. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1170, p. 1498-1505, 2007.

SILVA, C. S. P.; GENUÁRIO, D. B.; VAZ, M. G. M. V.; FIORE, M. F. Phylogeny of culturable cyanobacteria from Brazilian mangroves. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 37, p. 100-112, 2014.

SINGH, R. P.; KUMARI, P.; REDDY, C. R. K. Antimicrobial compounds from seaweedsassociated bacteria and fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 1571-1586, 2015.

SNOECK, R.; ANDREI, G.; DE CLERCQ, E. Current pharmacological approaches to the therapy of varicella zoster virus infections: a guide to treatment. **Drugs**, v. 57, p. 187-206, 1999.

SRIVASTAVA, A.; TIWARI, R.; SRIVASTAVA, V.; SINGH, T. B.; ASTHANA, R. K. Fresh water cyanobacteria *Geitlerinema* sp. CCC728 and *Arthrospira* sp. CCC729 as an anticancer drug resource. **PLoS ONE**, v. 10, p. 1-18, 2015.

STEWART, J. B.; BORNEMANN, V.; CHEN, J. L.; MOORE, R. E.; CAPLAN, F. R.; KARUSO, H.; LARSEN, L. K.; PATTERSON, G. M. L. Cytotoxic, fungicidal, nucleosides from blue green algae belonging to the Scytonemataceae. Journal of Antibiotics, v. 41, p. 1048-1056, 1988.

SUN, S. TIAN, L.; WANG, Y.; WU, H.; LU, X.; PEI, Y. A novel natural product from the fermentation liquid of marine fungus *Trichoderma atroviride* G20-12. Asian Journal of Traditional Medicines, v. 4, p. 123-127, 2009.

SUN, S.; TIAN, L.; WU, Z.; CHEN, G.; WU, H.; WANG, Y.; PEI, Y. Two new compounds from fermentation liquid of the marine fungus *Trichoderma atroviride* G20-12. Journal of Asian Natural Products Research, v. 11, p. 898–903, 2009.

SUN, P. X.; ZHENG, C.; LI, W.; JIN, G.; HUANG, F.; QIN, L. Trichodermanin A, a novel diterpenoid from endophytic fungus culture. **Journal of Natural Medicines**, v. 65, p. 381-384, 2011.

SURYANARAYANAN, T.S.; VENKATACHALAM, A.; THIRUNAVUKKARASU, N.; RAVISHANKAR, J. P.; DOBLE, M.; GEETHA, V. Internal mycobiota of marine macroalgae from the Tamilnadu coast: distribution; diversity and biotechnological potential. **Botanica Marina**, v. 53, p. 457-468, 2010.

SUZUKI, M. T.; PARROT, D.; BERG, G.; GRUBE, M.; TOMASI, S. Lichens as natural sources of biotechnologically relevant bacteria. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 100, p. 583-95, 2016.

SWAIN, S. S.; PADHY, R. N.; SINGH, P. K. Anticancer compounds from cyanobacterium Lyngby aspecies: a review. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 108, p. 223-265, 2015.

TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M., KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p. 2731-2739, 2011.

TAN, L. T. Filamentous tropical marine cyanobacteria: a rich source of natural products for anticancer drug discovery. **Journal of Applied Phycology**, v. 22, p. 659-676, 2010.

TATON, A.; WILMOTTE, A.; ŠMARDA, J.; ELSTER, J.; KOMÁREK, J. *Plectolyngbya hodgsonni*: a novel filamentous cyanobacterium from Antarctic lakes. **Polar Biology**, v. 34, p. 181-91, 2011.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J.; CLUSTAL, W. Improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TIAN, J.; YIN, Y.; SUN, H.; LUO, X. Magnesium chloride: an efficient 13C NMR relaxation agent for amino acids and some carboxylic acids. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 159, p. 137-144, 2002.

TREEWEEKE, N. R.; HITCHCOCK, P. B.; PARDOE, D. A.; CADDICK, S. Controlling diastereoselectivity in the reactions of enantiomerically pure α-bromoacyl-imidazolidinones with nitrogen nucleophiles: substitution reactions with retention or inversion of configuration. **Chemical Communications**, v. 14, p. 1868-1870, 2005.

TRONCOSO, N.; SAAVEDRA, R.; OLIVARES, A.; FARÍAS, J.; SAN-MARTÍN, S.; URRUTIA, H.; AGURTO, C. Identification of antibacterial compounds obtained from seaweeds present in the Biobío Region, Chile. **Revista de Biologia Marina y Oceanografia**, v. 50, p. 199-204, 2015.

TSAFACK, A.; LIBMAN, J.; SHANZER, A.; CABANTCHIK, Z. I. Chemical determinants of antimalarial activity of reversed siderophores. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, p. 2160-2216, 1996.

UTAGAWA, T.; MORISAWA, H.; MIYOSHI, T.; YOSHINAGA, F.; YAMAZAKI, A.; MITSUGI K. A novel and simple method for the preparation of adenine arabinoside by bacterial transglycosylation reaction. **FEBS Letters**, v. 109, p. 261-263, 1980.

VAZ, M. G. M. V.; GENUÁRIO, D. B.; ANDREOTE, A. P. D.; MALONE, C. F. S.; SANT'ANNA, C. L.; BARBIERO, L.; FIORE, M. F. *Pantanalinema* gen. nov. and *Alkalinema* gen. nov.: novel pseudanabaenacean genera (Cyanobacteria) isolated from saline–

alkaline lakes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, p. 298-308, 2015.

VOLK, R. B.; FURKERT, F. Antialgal, antibacterial and antifungal activity of two metabolites produced and excreted by cyanobacteria during growth. **Microbiology Research**, v. 161, p. 180-186, 2006.

VOLK, R. B. Studies on culture age versus exometabolite production in batch cultures of the cyanobacterium Nostoc insulare. **Journal of Applied Phycology**, v. 19, p. 491-495, 2007.

WALKER, I. G.; BUTLER, G. C. The sugar component of deoxyribonucleosides. Canadian Journal of Chemistry, v. 34, p. 1168-1175, 1956.

WANG, B.; DONG, J.; ZHOU, X.; LEE, K. J.; HUANG, R.; ZHANG, S.; LIU, Y. Nucleosides from the marine sponge *Haliclona* sp. Z. **Naturforschung C**, v. 64, p. 143-148, 2009.

WANG, Y.; LAI, Z.; LI, X.; YAN, R.; ZHANG, Z.; YANG, H.; ZHU, D. Isolation, diversity and acetylcholinesterase inhibitory activity of the culturable endophytic fungi harboured in Huperzia serrata from Jinggang Mountain, China. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, p. 1-23, 2016.

WATROUS, J.; ROACH, P.; ALEXANDROV, T.; HEATH, B. S.; YANG, J. Y.; KERSTEN, R. D.; VOORT, M.; POGLIANO, K.; GROSS, H.; RAAIJMAKERS, J. M.; MOORE, B. S.; LASKIN, J.; BANDEIRA, N.; DORRESTEIN, P. C. Mass spectral molecular networking of living microbial colonies. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, p. 1743-1752, 2012.

WHITLEY, R. J.; TUCKER, B. C.; KINKEL, A. W.; BARTON, N. H.; PASS, R. F.; WHELCHEL, J. D.; et al. Pharmacology, tolerance, and antiviral activity of vidarabine monophosphate in humans. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 18, p. 709-715, 1980.

WIBOWO, M.; PRACHYAWARAKORN, V.; AREE, T.; MAHIDOL, C.; RUCHIRAWAT, S.; KITTAKOOP, P. Cytotoxic sesquiterpenes from the endophytic fungus *Pseudolagarobasidium acaciicola*. **Phytochemistry**, v. 122, p. 126-138, 2016.

WOOD, R. Acute animal and human poisonings from cyanotoxin exposure - A review of the literature. **Environment International**, v. 91, p. 276–282, 2016.

WREDE, D; Taha, M.; Miranda, A. F.; Kadali, K.; Stevenson, T.; Ball, A. S.; Mouradov, A. Co-cultivation of fungal and microalgal cells as an efficient system for harvesting microalgal cells, lipid production and wastewater treatment. **PLoS ONE**, v. 9, p. 1-22, 2014.

YALÇIN, F. N., ERSÖZ, T., AKBAY, P., ÇALIS, I., DÖNMEZ, A. A. & STICHER, O. Phenolic, megastigmane, nucleotide, acetophenon and monoterpene glycosides from *Phlomis* samia and *P. carica*. **Turk Journal of Chemistry**, v. 27, p. 703-711, 2003.

YAN, X.; XUE-PING, S.; XIU-GUO, Z.; WAN-PING, T. Insecticidal activity of compounds from the South China Sea invertebrate *Scapharca subcrenata*. Chemistry of Natural Compounds, v. 51, p. 800-802, 2015.

YANG, J. Y.; SANCHEZ, L. M.; RATH, C. M.; LIU, X.; BOUDREAU, P. D.; BRUNS, N.; GLUKHOV, E.; WODTKE, A.; FELICIO, R.; FENNER, A.; WONG, W. R.; LININGTON, R. G.; ZHANG, L.; DEBONSI, H. M.; GERWICK, W. H.; DORRESTEIN, P. C. Molecular Networking as a Dereplication Strategy. **Journal of Natural Products**, v. 76, p. 1686-1699, 2013.

YOUSSEF, D. T. A.; BADR, J. M.; SHAALA, L. A.; MOHAMED, G. A. Ehrenasterol and biemnic acid: new bioactive compounds from the Red Sea sponge *Biemna ehrenbergi*. **Phytochemistry Letters**, v.12, p. 296-301, 2015.

YUE, Y.; YU, H.; LI, R.; XING, R.; LIU, S.; LI, P. Exploring the Antibacterial and Antifungal Potential of Jellyfish-Associated Marine Fungi by Cultivation-Dependent Approaches. **PLoS ONE**, v. 10, p. 1-16, 2015.

ZAMMIT, G.; BILLI, D.; ALBERTANO, P. The subaerophytic cyanobacterium *Oculatella subterranean* (Oscillatoriales, Cyanophyceae) gen. et sp. nov.: a cytomorphological and molecular description. **European Journal of Phycology**, v. 47, p. 341-354, 2012.

ZEHENDER, M.; JERON, A.; FABER, T.; BRUNNER, M.; JUST, H. Adenosine in treating cardiac arrhythmias. Journal of Autonomic Pharmacology, v. 16, p. 329-331, 1996.

ZHANG, G.; LI, J.; ZHU, I.; GU, Q.; LI, D. Advanced tools in marine natural drug discovery. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 42, p. 13-23, 2016.

ZHENG, C. J. SUN, P.; JIN, G.; QIN, L. Sesquiterpenoids from Trichoderma atroviride, an endophytic fungus in *Cephalotaxus fortunei*. **Fitoterapia**, v. 82, p. 1035-1038, 2011.

ZHOU, X; ZHU, H.; LIU, L.; LIN, L.; TANG, K. A review: Recent advances and future prospects of taxol-producing endophytic fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, p. 1707-1717, 2010.

ZUCK, K. M.; SHIPLEY, S.; NEWMAN, D. J. Induced production of N-formyl alkaloids from aspergillus fumigatus by co-culture with streptomyces peucetius. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 1653-1657, 2011.



ANEXO I

Tabela 4: Identidade (%) das sequencias de genes RNAr 16S entre as linhagens isoladas e outras linhagens de cianobactérias disponíveis no GenBank.

Linhagem	Comprimento (pb)	Correspondências mais próximas no GenBank (Número de acesso)	C* (%)	I** (%)
<i>Geitlerinema</i> sp. CENA552		Uncultured bacterium Pb-1y-7 (FN794239)	100	99,7
		Uncultured bacterium CpH7-1 (FN794262)	100	99,6
	1412	Uncultured bacterium Pb1y-46 (FN794241)	100	99,6
		Geitlerinema sp. PCC7105 (AF132780)	99	99,7
		Uncultured bacterium CpH7-9 (FN794263)	100	99,5
		Uncultured bacterium CpH7-49 (FN794267)	100	99,5
		Uncultured bacterium CpH4-3 (FN794257)	100	99,4
		Uncultured bacterium Pb1y-86 (FN794247)	100	99,4
		Geitlerinema sp. A28DM (FJ410907)	98	99,8
	1411	Uncultured Cyanobacterium Alchichica AL33_1_1B_32 (JN825331)	100	95,9
		Uncultured cyanobacterium Alchichica AL52 2 1B 11 (JN825330)	95	95,7
		Uncultured bacterium Dstr_B02 (GU118152)	99	93,9
		Oscillatoria acuminata PCC 6304 (KM019978)	100	93,6
<i>Leptolyngbya</i> sp.		Uncultured bacterium SGUS1412 (FJ202607)	100	93,5
CENA553		<i>Geitlerinema</i> sp. PCC 7407 (NR_102448)	100	93,5
		Uncultured Cyanobacterium Alchichica AQ1_1_1B_17 (JN825332)	100	93,3
		Leptolyngbya frigida ANT.L53B.2 (AY493576)	100	93,3
		Uncultured cyanobacterium H-A02 (DQ181685)	100	93,3
		Uncultured Cyanobacterium RJ088 (DQ181681)	100	93,2
	1412	Uncultured Cyanobacterium Alchichica AL33 1 1B 32 (JN825331)	100	95,7
		Uncultured cyanobacterium Alchichica AL 52, 2, 1B, 11 (IN825330)	95	95,4
		Uncultured bacterium Dstr B02 (GU118152)	99	93,6
		Oscillatoria acuminata PCC 6304 (KM019978)	100	93,4
Leptolyngbya sp.		Uncultured bacterium SGUS386 (EI202307)	100	03.3
CENA554		Geitlerinema sp. PCC 7407 (NR 102448)	100	93.3
		Uncultured bacterium SGUS1412 (FJ202607)	100	93,2
		Uncultured Cyanobacterium Alchichica AQ1_1_1B_17 (JN825332)	100	93,2
		Leptolyngbya frigida ANT.L53B.2 (AY493576)	100	93,0
		Uncultured cyanobacterium H-A02 (DQ181685)	100	93,0
<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA555	o. 1412	Uncultured Cyanobacterium Alchichica	100	95,8
		Uncultured cyanobacterium Alchichica	95	95,5
		Uncultured bacterium Dstr B02 (GU118152)	99	93,7

		Uncultured bacterium SGUS386 (FJ202307)	100	93,4
		Oscillatoria acuminata PCC 6304 (KM019978)	100	93,4
		Uncultured bacterium SGUS1412 (FJ202607)	100	93,3
		Geitlerinema sp. PCC 7407 (NR_102448)	100	93,3
		Leptolyngbya frigida ANT.L53B.2 (AY493576)	100	93,2
		Uncultured cyanobacterium H-A02 (DQ181685)	100	93,2
		Uncultured Cyanobacterium Alchichica AQ1_1_1B_17 (JN825332)	100	93,1
	. 1412	Uncultured bacterium Pb-1y-7 (FN794239)	100	99,6
		Uncultured bacterium CpH7-1 (FN794262)	100	99,5
		Uncultured bacterium Pb1y-46 (FN794241)	100	99,5
		Geitlerinema sp. PCC7105 (AF132780)	99	99,6
<i>Geitlerinema</i> sp. CENA556		Uncultured bacterium CpH7-9 (FN794263)	100	99,5
		Uncultured bacterium CpH7-49 (FN794267)	100	99,4
		Uncultured bacterium CpH4-3 (FN794257)	100	99,3
		Uncultured bacterium Pb1y-86 (FN794247)	100	99,3
		Geitlerinema sp. A28DM (FJ410907)	98	99,7
		Geitlerinema sp. BBD_P2b-1 (EF372580)	100	97,5
*Sequências	s publicadas; *	Cobertura, ** Identidade		

ANEXO II

Figura 22: Árvore filogenética das linhagens de cianobactérias coletadas no litoral de São Paulo.



ANEXO III

Figura 23: Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo positivo) da uridina (1). Pico em m/z 267,0600 corresponde ao aduto $[M + Na]^+$.



ANEXO IV

Figura 24: Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo negativo) da uridina (1). Pico em m/z 243,0616 corresponde ao aduto [M - H]⁻.



ANEXO V **Figura 25:** Espectro de RMN de ¹H da uridina (1), 500 MHz, CD₃OD.



ANEXO VI **Figura 26:** Espectro de RMN COSY¹H¹H da uridina (**1**), 500 MHz, CD₃OD.






ANEXO VIII **Figura 28:** Espectro de RMN HMBC da uridina (1), 500 MHz, CD₃OD.



ANEXO IX

Figura 29: Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo positivo) da 2'-deoxiuridina (2). Pico em m/z 251,0660 corresponde ao aduto $[M + Na]^+$. Display Report

Analysis Info Analysis Name	D'∖Data∖INEUSAO D	IBETA 19 08 2015\Eze	a CENA556	Acquisition Date 21-08 ASN 2 POS 1-13 01 1786	-2015 16:09:43
Method Sample Name Comment	MS_INFUSAO DIRETA_19_08_2015/62eq_CENA556_AS Ezeq_CENA556_ASN_2_POS			Operator BDAL@DE Instrument micrOTOF	213750.10361
Acquisition Par Source Type Focus Scan Begin Scan End	r ameter ESI Not active 50 m/z 1200 m/z	lon Polarity Set Capillary Set End Plate Offset	Positive 3500 V -500 V	Set Nebulizer Set Dry Heater Set Dry Gas Set Divert Valve	4.0 Bar 200 ℃ 9.0 l/min Source
Intens. x10 ⁵ 8-		1+ 301.1420			+MS, 0.2-0.6min #10-33
6-					
4-					
2-		1+		1+ 579.293	7
0	1+ 120.0801 166.0864 100 200	251.0660 36		525.2993 Ա.ա. ավերապետումի, ուրվա պատետրություն 500 6	091.4160 691.4160 m/z

ANEXO X

Figura 30: Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo negativo) da 2'-deoxiuridina (2). Pico em m/z 227.0616 corresponde ao aduto [M - H]⁻.















ANEXO XIV





ANEXO XV

Figura 35: Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo positivo) da timidina (3). Pico em m/z 265,0801 corresponde ao aduto $[M + Na]^+$.



ANEXO XVI

Figura 36: Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo negativo) da timidina (3). Pico em m/z 241,0828 corresponde ao aduto $[M - H]^-$.

Analysis Info Analysis Name Sample Name Acquisition Data Dibata/PROF GIULANO_CONTO 6-CENA 556 C2 - PICO 4_NEG.d Dibata/PROF GIULANO_CONTO 6-CENA 556 C2 - PICO 4_NEG.d Dibata/PROF GIULANO_CONTO 6-CENA 556 C2 - PICO 4_NEG.d Dibata/PROF GIULANO_CONTO 6-CENA 556 C2 - PICO 4_NEG.d BDAL@DE Instrument Internet and/o MS, 32-3.6min #190-212 MS, 32-3.6min #190-212 Internet and/o 241.0828 MS, 32-3.6min #190-212 0.8- 0.8- 0.8- 0.9- 0.9- 0.9- 0.9- 0.9- 0.9- 0.9- 0.9	Generic Display Report					
Interest x109 -MS, 3.2-3.6min #109-212 1.0 241.0828 0.8 0.6 0.6 255.2325 0.4 203.0801 0.2 203.0801 125.0253 227.2000 445.1744 445.1744 688.1493 0.0	Analysis Info Analysis Name Method Sample Name Comment	D:\Data\PROF GIULIANO_QO\TO 6-CENA 556 Cz Tune_Low_Tomaz_Neg_1300u_NOVO.m TO 6-CENA 556 Cz - PICO 4_NEG	Acquisition Date - PICO 4_NEG.d Operator Instrument	4/10/2015 4:08:36 PM BDAL@DE micrOTOF-Q II		
1.0- 0.8- 0.4- 0.2- 125,0253 227,200 0.4- 0.2- 125,0253 227,200 0.4- 0.2- 125,0253 227,200 0.4- 0.2- 125,0253 227,200 0.4- 0.2- 125,0253 227,200 0.4- 0.2- 125,0253 227,200 0.4- 0.2- 125,0253 227,200 0.4- 0.2- 0.4- 0.4- 0.2- 0.4- 0.4- 0.2- 0.4-	Intens. x10 ⁵			-MS, 3.2-3.6min #190-212		
0.8 0.6 0.6 0.6 0.6 0.6 0.6 0.6 0.6 0.6 0.6 0.6 0.6 $125,0253$ $227,2000$ $483,1747$ $445,1744$ $483,1747$ $688,1493$ 0.0	1.0-	241.0828				
0.8 0.6 0.6 0.4 255.2325 0.4 0.2 203.0801 203.0801 336.1464 483.1747 445.1744 445.1744 445.1744 445.1744 688.1493 0.0						
0.6 - 255 2325 $0.4 - 255 2325$ $0.4 - 203.0801 - 336.1464 - 483.1747 - 445.1744 - 44$	0.8-					
0.4 0.2 0.4 0.2 125.0253 227.2000 0.0 100 200 300 400 500 600 700 800 m/z	0.6-					
0.2- 125.0253 227.2000 445.1744 0.0- 100 200 300 400 500 600 700 800 m/z	0.4-	255.2325				
0.0	0.2-	203.0801 25.0253 227.2000 445.1744	1747 7.3206 688.:	1493		
	0.0 10	<u> , , , , ,, ,, ,, , , , , , , , , </u>	500 600	700 800 m/z		

Bruker Compass DataAnalysis 4.2 printed: 4/10/2015 4:21:49 PM by: BDAL@DE Page 1 of 1

ANEXO XVII **Figura 37:** Espectro de RMN de ¹H da timidina (**3**), 500 MHz, CD₃OD.



ANEXO XVIII **Figura 38:** Espectro de RMN COSY¹H¹H da timidina (**3**), 500 MHz, CD₃OD.



ANEXO XIX

Figura 39: Espectro de RMN HSQC da timidina (3), 500 MHz, CD₃OD.



ANEXO XX **Figura 40:** Espectro de RMN HMBC da timidina (**3**), 500 MHz, CD₃OD.



ANEXO XXI

Figura 41: Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo positivo) da adenosina (4). Pico em m/z 290,0867 corresponde ao aduto $[M + Na]^+$.



ANEXO XXII

Figura 42: Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo negativo) da adenosina (4). Pico em m/z 266,0900 corresponde ao aduto [M - H]⁻.



ANEXO XXIII **Figura 43:** Espectro de RMN de ¹H da adenosina (4), 500 MHz, CD₃OD.









ANEXO XXV **Figura 45:** Espectro de RMN HSQC da adenosina (**4**), 500 MHz, CD₃OD.

ANEXO XXVI





ANEXO XXVII

Figura 47: Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo positivo) da 2'deoxiadenosina (5). Pico em m/z 274,0912 e em m/z 252,1097 correspondem aos adutos [M + Na]⁺ e [M + H]⁺, respectivamente.



ANEXO XXVIII **Figura 48:** Espectro de RMN de ¹H da 2'-deoxiadenosina (**5**), 500 MHz, CD₃OD.











ANEXO XXXI **Figura 51:** Espectro de RMN HMBC da 2'-deoxiadenosina (**5**), 500 MHz, CD₃OD.

ANEXO XXXII

Figura 52: Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo positivo) da D-leucina (6). Pico em m/z 132,1013 corresponde ao aduto $[M + H]^+$.



ANEXO XXXIII

Figura 53: Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo negativo) da D-leucina (6). Pico em m/z 130,0858 corresponde ao aduto $[M - H]^{-}$. Display Report

		Dispia	y nepun		
Analysis Info Analysis Name Method Sample Name Comment	D:\Data\INFUSAO E MS_INFUSAO DIRE Ezeq_CENA556_AS	DIRETA_19_08_2015\Ez ETA_NEG_19-08-2015.r SN_1_NEG	eq_CENA556_ n	Acquisition Date 21-0 ASN_1_NEG_1-10_01_182 Operator BDAL@DE Instrument micrOTOF	3-2015 19:26:48 5.d <u>-</u> 213750.10361
Acquisition Pa Source Type Focus Scan Begin Scan End	rameter ESI Not active 50 m/z 1200 m/z	Ion Polarity Set Capillary Set End Plate Offset	Negative 3500 V -500 V	Set Nebulizer Set Dry Heater Set Dry Gas Set Divert Valve	4.0 Bar 200 °C 9.0 I/min Source
Intens. x10 ⁵⁻ 13(-	1- 0.0858				-MS, 0.1-0.6min #8-36
3-					
2-					
1-	1- 206.0794 1- 283.1610				
0- <u>11-11</u>	200 200	400	600	800 1	000 m/z
Bruker Compas	s DataAnalysis 4.2	printed: 21-08-201	5 19:44:09	by: BDAL@DE	1 of 1

printed: 21-08-2015 19:44:09 by: BDAL@DE Bruker Compass DataAnalysis 4.2

ANEXO XXXIV

Figura 54: Espectro de RMN de ¹H da D-leucina (6), 500 MHz, CD₃OD.



ANEXO XXXV **Figura 55:** Espectro de RMN COSY¹H¹H da D-leucina (6), 500 MHz, CD₃OD.



ANEXO XXXVI

Figura 56: Espectro de RMN HSQC da D-leucina (6), 500 MHz, CD₃OD.



ANEXO XXXVII

Figura 57: Espectro de RMN HMBC da D-leucina (6), 500 MHz, CD₃OD.



ANEXO XXXVIII

Figura 58: Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo positivo) da L-fenilalanina (7). Pico em m/z 166,0867 corresponde ao aduto $[M + H]^+$.



Bruker Compass DataAnalysis 4.2 printed: 21-08-2015 16:24:28 by: BDAL@DE 1 of 1

ANEXO XXXIX

Figura 59: Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo negativo) da L-fenilalanina (7). Pico em m/z 164,0700 corresponde ao aduto [M - H]⁻.

Display Report					
Analysis Info Analysis Name Method Sample Name Comment	D:\Data\INFUSAO DI MS_INFUSAO DIRE ⁻ Ezeq_CENA556_ASI	RETA_19_08_2015\Ez TA_NEG_19-08-2015.m N_2_2linha_NEG	eq_CENA556_ 1	Acquisition Date 21-08- ASN_2_2linha_NEG_1-15_01 Operator BDAL@DE Instrument micrOTOF	2015 19:47:50 _1829.d 213750.10361
Acquisition Par Source Type Focus Scan Begin Scan End	rameter ESI Not active 50 m/z 1200 m/z	lon Polarity Set Capillary Set End Plate Offset	Negative 3500 V -500 V	Set Nebulizer Set Dry Heater Set Dry Gas Set Divert Valve	4.0 Bar 200 ℃ 9.0 l/min Source
Intens. x10 ⁵ - - 1.50 - -	1- 164.0700				-MS, 0.1-0.5min #8-30
- - 1.25 - -					
- - 1.00 - - -					
0.75 -					
0.50 -					
0.25 -		1- 392.1453 1- 1341			
0.00	200	400	600	800 100	0 m/z
Bruker Compass	s DataAnalysis 4.2	printed: 21-08-2015	5 19:52:47	by: BDAL@DE	1 of 1

ANEXO XL **Figura 60:** Espectro de RMN de ¹H da L-fenilalanina (**7**), 500 MHz, CD₃OD.







ANEXO XLII **Figura 62:** Espectro de RMN HSQC da L-fenilalanina (**7**), 500 MHz, CD₃OD.

cena556_asn_2ii - 20 1.10 - 30 40 - 50 - 60 - 70 f1 (ppm) 1 . 1 - 80 . . 1 - 90 - 100 -110 - 120 -130 - 140 7.5 4.0 f2 (ppm) 3.5 2.5 2.0 1.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 3.0 1.0 0.5
ANEXO XLIII Figura 63: Espectro de RMN HMBC da L-fenilalanina (7), 500 MHz, CD₃OD.



ANEXO XLIV

Figura 64: Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo positivo) da agrobactina A (8). Pico em m/z 677,2432 corresponde ao aduto $[M + Na]^+$.



ANEXO XLV **Figura 65:** Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo negativo) da agrobactina A (8). Pico em m/z 653,2487 corresponde ao aduto [M - H]⁻.



ANEXO XLVI **Figura 66:** Espectro de RMN de ¹H da agrobactina A (**8**), 500 MHz, CDCl₃.





ANEXO XLVII **Figura 67:** Espectro de RMN COSY¹H¹H da agrobactina A (**8**), 500 MHz, CDCl₃.

ANEXO XLVIII

Figura 68: Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo positivo) da fotobactina (9). Pico em m/z 466,1559 corresponde ao aduto $[M + Na]^+$.



ANEXO XLIX

Figura 69: Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo negativo) da fotobactina (9). Pico em m/z 442,1602 corresponde ao aduto [M - H]⁻.









ANEXO LI **Figura 71:** Espectro de RMN COSY¹H¹H da fotobactina (**9**), 500 MHz, CDCl₃.





ANEXO LIII Figura 73: Espectro de RMN HMBC da fotobactina (9), 500 MHz, CDCl₃.



136

ANEXO LIV

Figura 74: Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo positivo) da agrobactina (10). Pico em m/z 659,2305 corresponde ao aduto $[M + Na]^+$.



Bruker Compass DataAnalysis 4.2 printed: 4/9/2015 5:21:12 PM by: BDAL@DE Page 1 of 1

ANEXO LV

Figura 75: Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo negativo) da agrobactina (**10**). Pico em m/z 643,2226 corresponde ao aduto [M - H]⁻.



ANEXO LVI **Figura 76:** Espectro de RMN de ¹H da agrobactina (**10**), 500 MHz, CDCl₃.





ANEXO LVII **Figura 77:** Espectro de RMN COSY¹H¹H da agrobactina (**10**), 500 MHz, CDCl₃.







ANEXO LIX Figura 79: Espectro de RMN HMBC da agrobactina (10), 500 MHz, CDCl₃.

ANEXO LX

Figura 80: Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo positivo) da substância (11). Pico em m/z 673,2451 corresponde ao aduto $[M + Na]^+$.



Bruker Compass DataAnalysis 4.2 printed: 4/9/2015 5:30:45 PM by: BDAL@DE Page 1 of 1

ANEXO LXI

Figura 81: Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo negativo) da substância (11). Pico em m/z 702,1589 corresponde ao aduto [M - H]⁻.







ANEXO LXIII **Figura 83:** Espectro de RMN COSY¹H¹H da substância (11), 500 MHz, CDCl₃.



ANEXO LXIV



Figura 84: Espectro de RMN HSQC da substância (11), 500 MHz, CDCl₃.



ANEXO LXV Figura 85: Espectro de RMN HMBC da substância (11), 500 MHz, CDCl₃.