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 Deboni

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

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 linhagens 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: 2-hexil,1-decanol, 3-octadeceno, neoftadieno e palmitato de metila. A partir da fração hexânica do extrato da linhagem *Geitlerinema* sp CENA556, foram identificados: dodecanal, 8-heptadeceno, 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 *Geitlerinema* 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 cianobactéria *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, 3-octadecene, neophytadiene, and methyl palmitate. Similarly, the compounds dodecanal, 8-heptadecene, palmitaldehyde, neophytadiene, phytol, methyl palmitoleate, methyl 7-hexadecenoate, 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.

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).

É 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 sobrevivência. 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, 2015; BOURGUET-KONDRACK & KORNPORST, 2014; GERWICK & FENNER, 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: o 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 semi-sintético 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

Atividade Biológica	Estrutura química
<p><u>Antitumoral</u></p>	<div data-bbox="518 392 1316 560"> <p>Bentruximab vedotina</p> </div> <div data-bbox="518 582 1316 929"> <p>Citarabina Deidrodidemmina B</p> </div> <div data-bbox="518 952 1316 1299"> <p>Trabectidina Mesilato de eribulina</p> </div>
<p><u>Antiviral</u></p>	<div data-bbox="686 1377 837 1612"> <p>Vidarabina</p> </div> <div data-bbox="941 1467 1149 1612"> <p>Aciclovir</p> </div>
<p><u>Analgésica</u></p>	<div data-bbox="574 1691 949 2049"> <p>Ziconotídeo</p> </div> <div data-bbox="997 1881 1260 2049"> <p>Tetrodotoxina</p> </div>

Continua Quadro 1:

Atividade Biológica	Estrutura química
<u>Inseticida</u>	 <chem>CN(C)C(CS(=O)N)CS(=O)N</chem> 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 (*microcryoprobe*s) 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 ópticas, 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; ENGINE 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 simbioses 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).

Figura 1: Aumento do número de publicações contendo a palavra *cyanobacteria* no banco de dados SciFinder®

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, antiprotazoal, 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 lipopeptídeo

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); análogos de aplysiatoxina (Quadro 2), 3-metoxiaplysiatoxina e 3-metoxidebromoaplysiatoxina 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

Atividade Biológica	Estrutura química
<u>Antitumoral</u>	<p>Kurahyne</p>
<u>Antiviral</u>	<p>Aplysiatoxina</p>
<u>Anti-obesidade</u>	<p>Yoshinona A</p>
<u>Canabinomimética</u>	<p>Mooreamida A</p>

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 biossintéticos, 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, ENGINE 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 endossimbiose 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 biodiversidade 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 aloquímicos, 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 significativamente 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; ENGINE 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* (ENGINE 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 (ENGINE et al. 2012; ENGINE 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.

Figura 2: Metabólitos isolados de cianobactérias do gênero *Geitlerinema*.

A descoberta dos nucleosídeos esponjosina, 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 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 *Geitlerinema* 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 antibióticos denominados *peptaibols*, que são peptídeos lineares que caracterizados pela presença de vários aminoácidos não proteínogênicos 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 (NAGOB & 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 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 Microbiology**, 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 swinholid 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. Co-culture of microalgae, cyanobacteria, and macromycetes for exopolysaccharides production: Process preliminary optimization and partial characterization. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, p. 1092-1106, 2012.
- ANGERMAIR, 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. 1ª 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. Tetrodotoxin: 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.; KORNPORST, 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 marine filamentous 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, p. 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 next-generation 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.; MENDELSON, 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.

ENGINE, 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.

ENGINE, 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.

ENGINE, 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.

ENGINE, 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.

ENGINE, 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.

IORE, 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.

IORE, 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.; IORE, 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.; IORE, 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 DL-phenylalanine 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. **Journal 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 constituents 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. Synthesis 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 therapeutic 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.

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

MEVERS, E.; MATAINAHU, 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 cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* 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, 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 Journal of General 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 sponge-associated *Trichoderma atroviride*. **Marine Drugs**, v. 11, p. 4937-4960, 2013.

PEREIRA, A. R.; CAO, Z.; ENGINE, 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.; KOVÁČIK, 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 therapy**. 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.; IBÁÑEZ, 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. Characterization 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 seaweeds-associated 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 *Lyngbya* species: 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. *Plectolynghya 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 Biología Marina y Oceanografía**, 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.; WHELCHER, 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, acetophenone 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.