UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

LAURA PAVAN IÓCA

**Descoberta e estudos de biossíntese de peptídeos não-ribossomais
envolvidos na motilidade de *Pseudovibrio brasiliensis* Ab134**

São Carlos
2020

Laura Pavan Ióca

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

**Descoberta e estudos de biossíntese de peptídeos não-ribossômicos
envolvidos na motilidade de *Pseudovibrio brasiliensis* Ab134**

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos
da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos
para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Química Orgânica e Biológica

Orientador: Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck

São Carlos

2020

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Roberto G. S. Berlinck pelas oportunidades, orientação e apoio, ao longo dos últimos 10 anos, responsável pela minha formação acadêmico-científica.

À Profa. Dra. Alessandra S. Eustáquio (The University of Illinois at Chicago, UIC), por me receber em seu grupo de pesquisa, sempre disponível para discussões e guiando cada tomada de decisão. Obrigada pela orientação, paciência e conselhos.

A todos os colegas do Grupo de Química Orgânica de Sistemas Biológicos pela amizade, sugestões e companhia nas longas semanas de HPLC e desenvolvimento de experimentos de cultivos intermináveis. Em especial, à Dra. Fabiana T. R. Martinelli e Dra. Karin F. B. Camargo pelo apoio técnico.

Aos Prof. Dr. Alekej Krunic (UIC), Profa. Dra. Laura M. Sanchez (UIC) e Prof. Dr. Antônio G. Ferreira (Universidade Federal de São Carlos, UFSCar) pelo apoio técnico na aquisição de dados de ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas.

Aos amigos, antigos e novos, que fizeram essa caminhada mais acolhedora, principalmente a Carol, Juliano, Mirelle, Vítor, Jairo, Leandro, Camila, Karen e Renata. À Tanja, Xue, Jana, Sylvia, Kyle, Tuan-Anh, Taylor, Sean e Victor, que apesar do pouco tempo compartilhado, me fizeram sentir em casa durante o intercâmbio.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela Bolsa de Doutorado no País (Proc. FAPESP 2016/05133-7) e pela Bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior (Proc. FAPESP 2018/10742-8) e por todo o apoio financeiro para o desenvolvimento e divulgação deste projeto.

Por fim, à minha família, por entender as longas horas à frente do computador e os horários de trabalho não muito usuais no laboratório.

“We sent this craft in peace to learn about Mars’ past and about our future. To those who visit here, we wish a safe journey and the joy of discovery.” Mars Sundial.

RESUMO

IÓCA, L. P. **Descoberta e estudos de biossíntese de peptídeos não-ribossomais envolvidos na motilidade de *Pseudovibrio brasiliensis* Ab134**. 2020. 212 p. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020.

Neste trabalho foram investigados metabólitos envolvidos na motilidade da α -Proteobactéria marinha *Pseudovibrio brasiliensis* Ab134, utilizando-se dados de sequenciamento do genoma, experimentos de inativação gênica e técnicas de cultivo em laboratório. O uso de análises de bioinformática permitiu identificar um *gene cluster* de biossíntese mista de peptídeo não-ribossomal sintetases e policetídeo sintase conservado em linhagens de *Pseudovibrio* spp. e *Pseudomonas* spp.. A inativação de genes por recombinação homóloga em *P. brasiliensis* Ab134, levou a descoberta dos heptapeptídeos pseudovibriamidas A1-6 e dos depsipeptídeos pseudovibriamidas B1-6, codificados por esse *gene cluster*. Estes compostos apresentam uma conexão via uma ureia, ao invés da uma ligação peptídica conectando os primeiros dois resíduos de aminoácidos. Outras modificações incluem um resíduo de ácido desidroaminobutírico, e um heterociclo tiazol. Bioensaios de motilidade mostraram que o mutante *pppA*, o qual não produz nenhum dos compostos, tem sua habilidade de *swarm* reduzida e formação de biofilme aumentada. Já os mutantes *pppD*, produtores apenas das pseudovibriamidas A, mantiveram sua habilidade de *swarm*, porém a formação de biofilme foi reduzida. Estes experimentos indicaram que os peptídeos produzidos por *P. brasiliensis* Ab134 podem atuar nos fenótipos relacionados à colonização de seu hospedeiro, a esponja marinha *Arenosclera brasiliensis*.

Palavras chaves: bactéria marinha, peptídeos, *genome mining*, produtos naturais, biossíntese, *swarm*, biofilme.

ABSTRACT

IÓCA, L. P. **Discovery and biosynthetic studies of non-ribosomal peptides involved in *Pseudovibrio brasiliensis* Ab134 motility**. 2020. 212 p. Thesis (PhD) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020.

The present study investigated the metabolites involved on *Pseudovibrio brasiliensis* Ab134 motility, a marine alpha-Proteobacteria, by using genome sequencing data, gene inactivation experiments and laboratory cultivation techniques. Bioinformatics analyzes allowed the identification of a mixed biosynthetic gene cluster of non-ribosomal peptide synthetases and polyketide synthase conserved in *Pseudovibrio* and *Pseudomonas* strains. Gene knock-out in *P. brasiliensis* Ab134 led the discovery of the compounds encoded by this cluster gene, the heptapeptides pseudovibriamide A1-6 and the depsipeptides pseudovibriamides B1-6. These compounds have a ureido-linkage instead of a peptide bond connecting the first two amino acid residues. Other modifications include a dehydroaminobutyric acid residue, and a thiazole heterocycle. Motility bioassays have shown that the *pppA* mutant, which does not produce any of the compounds, has reduced swarm motility and increased biofilm formation. The *pppD* mutants, which produce only pseudovibriamides A, maintained their swarm phenotype, but biofilm formation was impaired. These experiments suggest that the peptides produced by *P. brasiliensis* Ab134 can influence on phenotypes related to the colonization of the eukaryotic host, the marine sponge *Arenosclera brasiliensis*.

Keywords: marine-derived bacteria, peptides, genome mining, natural products, biosynthesis, swarm, biofilm.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Origem dos fármacos aprovados entre 1981-2019 (n = 1394).....	19
Figura 1.2 – Organização dos domínios enzimáticos das PKS (A e B) e NRPS (C e D).	22
Figura 1.3 – Diversidade da comunidade microbiana em esponja marinhas, considerando dados do banco de dados Global Sponge Microbiome (A), e sequências de rRNA 16S em amostras individuais (B e C). Em B, amostras de esponja marinhas são representadas em laranja, de água do mar em azul e de sedimentos em marrom. Gráfico de dissimilaridade Bray-Curtis das amostras individuais presentes em B; símbolos coloridos representam amostras de esponja marinhas, círculo preto/branco amostras da água de mar e asterisco representa amostra de sedimento (C).	24
Figura 1.4 – Produtos naturais isolados a partir de esponjas marinhas e a partir do meio de cultivo de microrganismos do ambiente marinho (azul) ou terrestre (vermelho).	26
Figura 1.5 – Produtos naturais isolados a partir de esponjas marinhas e detectados por técnicas de hibridização (azul) ou que tiveram o <i>gene cluster</i> responsável pela biossíntese de compostos detectado em amostras de metagenoma (vermelho).	27
Figura 1.6 – Produtos naturais com esqueletos de carbono similares isolados a partir de esponjas marinhas (azul) e produzidos em cultura por microrganismos (vermelho) ou detectados em análises de metagenoma (preto).	28
Figura 1.7 – Representação esquemática da detecção de <i>Pseudovibrio</i> spp., contabilizando métodos dependentes e independentes e cultivo, em diferentes nichos ecológicos, considerando-se distribuição geográfica (A), frequência de detecção (B) e abundância relativa de sequências de rRNA 16S em comunidades bacterianas (C).	30
Figura 1.8 – Comparação filogenética (A) e detecção de sequências de rRNA 16S de diferentes espécies de <i>Pseudovibrio</i> spp. de acordo com o nicho ecológico (B).	31
Figura 1.9 – Produtos naturais produzidos em meio de cultura por linhagens de <i>Pseudovibrio</i> spp.	32
Figura 1.10 – Mecanismos de motilidade de bactérias, destacando-se os filos/classes em que esses mecanismo já foram descritos.....	34
Figura 4.1 – Esquema de fragmentação apresentando a nomenclatura proposta por Roepstorff-Fohlmann-Biemann dos fragmentos formados para um tripeptídeo hipotético.	38
Figura 4.2 – Dibromotirosinas isoladas ou detectadas em extrato do meio de cultivo de <i>P. brasiliensis</i> Ab134.	44
Figura 4.3 – Desenho experimental para deleção de gene alvo em <i>P. brasiliensis</i> Ab134 via substituição por gene de resistência a kanamicina (<i>neo</i>).	47
Figura 4.4 – Desenho experimental para deleção <i>in frame</i> de gene alvo em <i>P. brasiliensis</i> Ab134.	49

Figura 4.5 – Foto das culturas de <i>P. brasiliensis</i> Ab134 com e sem algodão (A) e destaque para a quantidade de células presente no meio líquido após centrifugação (B) nas mesmas culturas.....	53
Figura 4.6 – Fluxograma de fracionamento do extrato F, obtido a partir do cultivo de <i>P. brasiliensis</i> Ab134 em 400 placas contendo meio semissólido.....	55
Figura 4.7 – Fluxograma de fracionamento do extrato FD, obtido a partir do cultivo de <i>P. brasiliensis</i> Ab134 em 600 placas contendo meio semissólido liofilizadas.	57
Figura 4.8 – A) Imagem de uma placa de <i>swarm</i> antes e durante a recuperação das células (espátula com células à direita). B) Foto do volume de células obtido a partir de 500 placas de <i>swarm</i> após congelamento e degelo. C) Imagem do meio de cultivo liofilizado.....	58
Figura 4.9 – Fluxograma de fracionamento do extrato C, obtido a partir das células após o cultivo de <i>P. brasiliensis</i> Ab134 em 1000 placas contendo meio semissólido.	59
Figura 5.1 – Resultados do desenho experimental para confirmar a presença de plasmídeos e completar <i>gaps</i> no genoma de <i>P. brasiliensis</i> Ab134. A) Representação das PCR, considerando o sítio de ligação do par de primers utilizado para confirmar os plasmídeos 1, 2, 4, e 5, a partir das sequências NODES 2, 3, 6, e 7. Setas duplas indicam sobreposições de sequências obtidas diretamente após o sequenciamento do genoma por Illumina e Nanopore (vermelho), ou amplificadas por PCR (azul). B) Foto do gel de agarose controle para avaliar o tamanho dos amplicons obtidos nas PCR.	62
Figura 5.2 – Representação do genoma completo de <i>P. brasiliensis</i> Ab134. A origem de replicação de cada replicon e os BGC codificados por cada um são destacados. <i>Gaps</i> são indicados por setas pretas.	62
Figura 5.3 – Rota de biossíntese hipotética para o ácido verongidóico (A). Diferentes unidades biossintéticas de compostos mais complexos pertencentes a classes das dibromotirosinas (B).	65
Figura 5.4 – Estrutura dos PNs dos quais genes foram utilizados para busca de enzimas putativas para a biossíntese das dibromotirosinas.	67
Figura 5.5 – Arquitetura dos domínios codificados pelo NRPS-PKS BGC de <i>P. brasiliensis</i> Ab134.	68
Figura 5.6 – Estruturas das rimosamidas e detoxinas.....	68
Figura 5.7 – Comparação do NRPS-PKS BGC de <i>P. brasiliensis</i> Ab134 NRPS e BGCs homólogos de <i>Pseudomonas</i> spp. (B) e <i>Streptomyces</i> spp. (C). Genes homólogos são mostrados na mesma cor. Aqui são representados os BGC de <i>Pseudovibrio brasiliensis</i> Ab134, <i>Pseudomonas asplenii</i> NRRL-B733DP, <i>Ps. entomophila</i> L48 e <i>Streptomyces rimosus</i> NRRL B2660, respectivamente.....	69
Figura 5.8 – Representação gráfica da abrangência dos <i>ppp</i> BGCs homólogos nos genomas de <i>Pseudovibrio</i> spp. e <i>Pseudomonas</i> spp.....	70
Figura 5.9 – Arquitetura dos domínios codificados pelo <i>ppp</i> BGC de <i>P. brasiliensis</i> Ab134 e alguns BGC homólogos representativos de <i>Pseudovibrio</i> spp. e <i>Pseudomonas</i> spp.....	71

- Figura 5.10 – Foto do gel de agarose obtido após amplificação por PCR da região contendo *pppA*.73
- Figura 5.11 – Representação gráfica do mapeamento do genoma de *P. brasiliensis* Ab134 (linha preta), perante os dados brutos obtidos após sequenciamento por Illumina do genoma de *pppA*⁻ (linha laranja). A cobertura dos *reads* obtidos é apresentada em azul. A anotação dos genes para a linhagem WT é mostrada em cinza.73
- Figura 5.12 – Espectro de massas obtido por MALDI-TOF DD de extratos de *P. brasiliensis* Ab134 WT (B) e mutantes, *pppA* (C) e *pppD* (D). MB (A) foi utilizado como controle negativo.74
- Figura 5.13 – Espectros de massas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS² dos compostos produzidos pelo *ppp* BGC de *P. brasiliensis* Ab134 de *m/z* 844,3 (A), 1156,5 (B), e 1170,5 (C).75
- Figura 5.14 – Foto do gel de agarose obtido após amplificação por PCR da região contendo *pppD*.76
- Figura 5.15 – Representação gráfica da localização dos compostos produzidos por *P. brasiliensis* Ab134 WT e mutantes, *pppA* e *pppD* (B). Dados obtidos por análises por MALDI-TOF IMS.76
- Figura 5.16 – Foto das linhagens *P. brasiliensis* Ab134 WT e *pppA*⁻ em placas de MA estriadas (A) e ampliação das colônias evidenciando a diferença de diâmetro (B)...77
- Figura 5.17 – Fotos representativas do bioensaio de *swarming* para *P. brasiliensis* Ab134 comparando-se os ágar da marca Bacto (A/C) e Eiken (B/D).78
- Figura 5.18 – Evolução do *swarming* de *P. brasiliensis* Ab134 em placa de meio semissólido de MB + 0,5 % ágar Eiken, incubada à 30 °C, à 15, 20, 24 e 40 h após o inóculo.78
- Figura 5.19 – Fotos representativas comparando-se o fenótipo de *swarming* de *P. brasiliensis* Ab134 WT e os mutantes *pppA* e *pppD*, após 24h e 48h de crescimento à 30 °C.79
- Figura 5.20 – Fotos representativas comparando-se o fenótipo de *swimming* de *P. brasiliensis* Ab134 WT e os mutantes *pppA* e *pppD*, após 24h e 48h de crescimento à 30 °C.80
- Figura 5.21 – Foto comparando a ação surfactante de cultura de células (A) e extratos (B) de *P. brasiliensis* Ab134 WT e mutantes *pppA* e *pppD*. Solução de 0,1% Tween 20 foi utilizada como controle positivo e água como controle negativo.81
- Figura 5.22 – Resultado do bioensaio de formação de biofilme para de *P. brasiliensis* Ab134 WT e mutantes *pppA* e *pppD* em dois períodos de crescimento (24h e 48 h), utilizando-se o mesmo inóculo. A medida dos mutantes considera média de absorbância de todas as réplicas biológicas para *pppA*⁻ e *pppD*⁻.81
- Figura 5.23 – Espectro de massas obtido por MALDI-TOF DD de extratos de *P. brasiliensis* Ab134 em cultivo contendo bolas de algodão (A) e ampliação do espectro na região entre 1150-1180 Da (B).83
- Figura 5.24 – Espectro de massas obtido por MALDI-TOF DD de extratos de *P. brasiliensis* Ab134 em cultivo contendo bolas de algodão (em vermelho) e a partir de culturas em meio semissólido (em azul).84

Figura 5.25 – Espectro de massas do composto presente na fração F2B67D3. A) HRMS-ESI ⁺ e B) HRMS-ESI ⁻	85
Figura 5.26 – Correlações nos espectros de HQSC-TOCSY, COSY e HMBC para determinar a presença dos aminoácidos Tyr, Arg, Gln, Pro e Ala no composto presente na fração F2B67D3.	86
Figura 5.27 – Mecanismo hipotético para a formação do heterociclo tiazol (A). Correlações nos espectros de HMBC para determinar o sistema Pro-thz presente no composto na fração F2B67D3 (B).	87
Figura 5.28 – Correlações nos espectros de HSQC-TOCSY, COSY e HMBC para determinar a presença resíduo de Dhb no composto presente na fração F2B67D3.	87
Figura 5.29 – Correlações nos espectros de COSY e HMBC para determinar a conectividade entre os resíduos de aminoácidos no composto presente na fração F2B67D3.	88
Figura 5.30 – Espectros de massas obtido por UPLC-QTOF-MS ² para o composto presente na amostra F2B67D3 (<i>m/z</i> 844,3).	89
Figura 5.31 – Relações para determinar a estrutura do composto presente na fração F2B67D3. A) Correlações nos espectros de COSY, HMBC e HSQC ¹⁵ N para determinar a presença da conexão ureia entre os resíduos de Tyr e Dhb. B) Esquema de fragmentação.	89
Figura 5.32 – Estruturas de peptídeos não-ribossomais representativos de suas classes que contém o uma conexão ureia (destacada em azul) em sua estrutura e que tem BGC reportado na literatura.	93
Figura 5.33 – Mecanismo hipotético catalisado pelo gene SylC para a formação da conexão via ureia no composto siringolina C.	94
Figura 5.34 – Análise filogenética dos domínios de condensação de BGCs que produzem peptídeos não-ribossomais com conexão via ureia.	95
Figura 5.35 – Visualização do alinhamento da sequência de aminoácidos dos domínios de condensação dos BGCs de PNs que contém uma conexão via ureia. Destaca-se os domínios responsáveis pela formação desta ligação.	96
Figura 5.36 – Peptídeos não-ribossomais que contém o resíduo Dhb em seu esqueleto, destacado em verde.	97
Figura 5.37 – Análise filogenética dos domínios de condensação dos <i>ppp</i> , <i>mcy</i> e <i>nod</i> BGCs.	98
Figura 5.38 – Análise filogenética dos domínios de condensação que codificam para Ser, Thr ou dhAla/Dhb de BGCs que produzem peptídeos não-ribossomais com resíduos Dha/Dhb.	99
Figura 5.39 – Peptídeos que apresentam o sistema Pro-thz em seu esqueleto, destacado em roxo.	100
Figura 5.40 – PNs que contém o heterociclo tiazol em seu esqueleto e que tiveram seu BGC estudado.	101
Figura 5.41 – Espectro de massas do composto presente na fração F2B67D1/FD2B3D1. A) HRMS-ESI ⁺ e B) HRMS-ESI ⁻	102

Figura 5.42 – Espectro de massas obtido por UPLC-QTOF-MS ² para o composto presente na amostra F2B67D1/FD2B3D1 (<i>m/z</i> 826,3).....	103
Figura 5.43 – Correlações chaves nos espectros de COSY e HMBC para determinar a presença do anel imidazilidinil-dione no composto presente na fração F2B67D1/FD2B3D1.	104
Figura 5.44 – Compostos representativos encontrados em levantamento bibliográfico de PNs que contém heterociclo imidazilidinil-diona, destacado em vermelho.....	106
Figura 5.45 – Espectro de massas do composto presente na fração FD2B3A1. A) HRMS-ESI ⁺ e B) HRMS-ESI ⁻	107
Figura 5.46 – Espectro de massas obtido por UPLC-QTOF-MS ² para o composto presente na amostra FD2B3A1 (<i>m/z</i> 830,3).....	108
Figura 5.47 – Espectro de massas do composto presente na fração FD2B3C1. A) HRMS-ESI ⁺ e B) HRMS-ESI ⁻	109
Figura 5.48 – Espectro de massas obtido por UPLC-QTOF-MS ² para o composto presente na amostra FD2B3C1 (<i>m/z</i> 812,3).....	110
Figura 5.49 – Dados obtidos por UPLC-QTOF-MS ² para a fração FD2B2A (<i>m/z</i> 858,3), cromatograma (A) e espectro de massas em <i>t_r</i> 4,7 (B) e <i>t_r</i> 4,8 (C).	112
Figura 5.50 – Espectro de massas do composto presente na fração C23C1B. A) HRMS-ESI ⁺ e B) HRMS-ESI ⁻	113
Figura 5.51 – Espectro de massas do composto presente na fração C23C1B. A) HRMS-ESI ⁺ e B) HRMS-ESI ⁻	114
Figura 5.52 – Espectro de massas do produto de degradação da pseudovibriamida A1: A) HRMS-ESI ⁺ , B) HRMS-ESI ⁻ e C) MS ² ; e MS ² do composto presente na amostra C23C1B com <i>m/z</i> 950,4 (D).	115
Figura 5.53 – A) Mecanismo hipotético para a degradação das pseudovibriamidas. B) Estrutura do produto de degradação da pseudovibriamida A1 (1). C) Esquema de fragmentação.	116
Figura 5.54 – Correlações nos espectros de COSY e HMBC para determinar a presença da pseudovibriamida A1 como subestrutura no composto presente na fração C23C1B.....	117
Figura 5.55 – Correlações nos espectros de HQSC-TOCSY, COSY e HMBC para determinar a presença resíduo de Val e Hyp modificada no composto presente na fração C23C1B.....	118
Figura 5.56 – Espectro de massas do composto presente na fração C23C1C. A) HRMS-ESI ⁺ e B) HRMS-ESI ⁻	121
Figura 5.57 – Comparação dos cromatogramas obtidos em análise de UPLC-QTOF-MS da hidrólise dos compostos presentes na fração C23C1C e derivatizados com + L-FDTA (A), e padrões dos aminoácidos L-Ile + L-FDTA (B), L- <i>allo</i> -Ile + L-FDTA (C) e L-Leu + L-FDTA (D).....	122
Figura 5.58 – Espectro de massas do composto presente na fração C23C1A. A) HRMS-ESI ⁺ e B) HRMS-ESI ⁻ e C) MS ² (<i>m/z</i> 1142,5).	124
Figura 5.59 – Espectro de massas do composto presente na fração C23C1D. A) HRMS-ESI ⁺ e B) HRMS-ESI ⁻ e C) MS ² (<i>m/z</i> 1152,5).	126

Figura 5.60 – Foto do gel de agarose obtido após amplificação por PCR da região contendo <i>pppH</i> (A), <i>pppI</i> (B) e <i>pppJ</i> (C).....	128
Figura 5.61 – Espectro de massas obtido por MALDI-TOF DD de extratos de <i>P. brasiliensis</i> Ab134 WT (B) e mutantes, <i>pppH</i> (C), <i>pppI</i> (D) e <i>pppJ</i> (E). MB (A) foi utilizado como controle negativo.	129
Figura 5.62 – Organização do <i>ppp</i> BGC e mecanismo hipotético para a produção das pseudovibriamidas.	131

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 – Montagem final do genoma completo de <i>P. brasiliensis</i> Ab134, destacando-se os resultados da comparação por homologia para a origem de replicação de cada replicon.....	63
Tabela 5.2 – BGCs encontrados no genoma <i>P. brasiliensis</i> Ab134.....	67
Tabela 5.3 – Função putativa dos genes do NRPS-PKS BGC de <i>P. brasiliensis</i> Ab134 predita por homologia de blastp.	72
Tabela 5.4 – Íons fragmentos originados pela quebra da ligação amida identificados em análise por UPLC-QTOF-MS ² para o composto presente na amostra F2B67D3 (<i>m/z</i> 844,3).	90
Tabela 5.5 – Dados de RMN de ¹ H, DEPTQ ¹³ C e ¹⁵ N da amostra F2B67D3 em DMSO- <i>d</i> ₆ + TFA (¹ H: 900 MHz, ¹³ C: 226 MHz, ¹⁵ N: 91 MHz).....	91
Tabela 5.6 – Íons fragmentos identificados em análise por UPLC-QTOF-MS ² para o composto presente na amostra F2B67D1/FD2B3D1 (<i>m/z</i> 826,3).	103
Tabela 5.7 – Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da amostra F2B67D1/FDB3D1 em DMSO- <i>d</i> ₆ (¹ H: 600 MHz, ¹³ C: 150 MHz, ¹ H*: 900 MHz).	105
Tabela 5.8 – Íons fragmentos identificados em análise por UPLC-QTOF-MS ² para o composto presente na amostra FD2B3A1 (<i>m/z</i> 830,3).	108
Tabela 5.9 – Íons fragmentos identificados em análise por UPLC-QTOF-MS ² para o composto presente na amostra FD2B3C1 (<i>m/z</i> 812,3).	110
Tabela 5.10 – Íons fragmentos selecionados observados em análises por UPLC-QTOF-MS ² da amostra FD2B2A (<i>m/z</i> 858,3).	112
Tabela 5.11 – Íons fragmentos identificados em análise por UPLC-QTOF-MS ² para o produto de degradação da pseudovibriamida A1 (<i>m/z</i> 638.2).....	116
Tabela 5.12 – Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da amostra C23C1B em DMSO- <i>d</i> ₆ (¹ H: 600 MHz, ¹³ C: 150 MHz).	119
Tabela 5.13 – Íons fragmentos identificados em análise por UPLC-QTOF-MS ² para o composto presente na amostra C23C1B (<i>m/z</i> 1156,5).	120
Tabela 5.14 – Íons fragmentos identificados em análise por UPLC-QTOF-MS ² para o composto presente na amostra C23C1C (<i>m/z</i> 1170,5).	122
Tabela 5.15 – Íons fragmentos identificados em análise por UPLC-QTOF-MS ² para o composto presente na amostra C23C1A (<i>m/z</i> 1140,5).	125
Tabela 5.16 – Íons selecionados identificados em análise por UPLC-QTOF-MS ² da amostra C23C1D (<i>m/z</i> 1152,5).....	126

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

δ	Deslocamento químico
λ	Comprimento de onda
BGC	<i>Biosynthetic gene cluster</i> (agrupamento gênico de biossíntese)
COSY	<i>Homonuclear Correlation Spectroscopy</i>
DCO	<i>Double crossover</i>
DD	<i>Dried Droplet</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
ELSD	<i>Evaporative Light Scattering Detector</i> (detector evaporativo de espalhamento de luz)
FDTA	5-fluor-2,4-dinitrofenil-N α -L-triptofanamida
gDNA	DNA genômico
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (cromatografia líquida de alta eficiência)
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
IMS	<i>Imaging mass spectrometry</i> (imageamento por espectrometria de massas)
J	Constante de acoplamento
LB	Luria-Bertani
m/z	Razão massa/carga
MA	<i>Marine agar</i> (ágar marinho)
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption</i> (espectrometria de massas com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz)
MB	<i>Marine broth</i> (caldo marinho)
MS	<i>Mass spectrometry</i> (espectrometria de massas)
MT	mutante
NRPS	<i>Non-ribosomal peptide synthetase</i> (sintetases peptídicas não-ribossomais)
ORF	<i>Open Reading Frames</i> (fase de leitura aberta)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (reação em cadeia de polimerase)
PDA	<i>Photodiode array detector</i> (setector de arranjo de diodos)
PKS	<i>Polyketide synthase</i> (policetídeo sintase)
<i>ppp</i>	Pseudovibrio Pseudomonas Peptide

QTOF	<i>Quadrupole Time-of-Flight, tandem mass spectrometry</i> (espectrometria de massas de alta resolução quadrupolar e tempo de voo)
RiPP	<i>Ribosomally synthesized and Post-translationally modified peptides</i> (peptídeos ribossomais)
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico)
ROESY	<i>Rotating-frame Overhauser Spectroscopy</i>
rRNA	RNA ribossomal
SCO	<i>Single crossover</i>
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>
TOF	<i>Time-of-Flight</i> (analisador de tempo de voo)
t _R	Tempo de retenção
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i> (cromatografia líquida de ultra eficiência)
UV	Ultravioleta
WT	<i>Wild-type</i> (linhagem selvagem)

SUMÁRIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	xiv
1 INTRODUÇÃO	19
1.1 A pesquisa de produtos naturais de microrganismos.....	19
1.2 Biossíntese de produtos naturais	20
1.3 Esponjas marinhas e o microbioma associado	23
1.4 O gênero <i>Pseudovibrio</i>	28
1.5 Motilidade bacteriana e formação de biofilme	32
2 JUSTIFICATIVA	35
3 OBJETIVOS	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 Equipamentos e generalidades	37
4.1.1 Espectrometria de massas.....	37
4.1.2 Ressonância magnética nuclear	39
4.1.3 Fracionamento cromatográfico.....	39
4.1.4 Solventes	40
4.1.5 Sequenciamento de genoma	40
4.1.6 Análises de bioinformática	41
4.1.7 Primers e Enzimas	41
4.1.8 Reação em cadeia da polimerase e análises controle por eletroforese em gel	42
4.2 <i>Pseudovibrio brasiliensis</i> Ab134	43

4.2.1 Linhagens bacterianas	43
4.2.2 Reativação da produção de dibromotirosinas por <i>P. brasiliensis</i> Ab134...	43
4.2.3 Mapa genético de <i>P. brasiliensis</i> Ab134	45
4.2.4 Procedimento de genética reversa em <i>P. brasiliensis</i> Ab134	46
4.2.5 Bioensaios de motilidade flagelar.....	49
4.2.6 Ensaio de produção de surfactante.....	50
4.2.7 Bioensaio de formação de biofilme	50
4.2.8 Avaliação de metodologias de cultivo e extração para isolamento de compostos produzidos por <i>P. brasiliensis</i> Ab134.....	50
4.2.9 Isolamento e determinação estrutural das pseudovibriamidas produzidas por <i>P. brasiliensis</i> Ab134 em meio semissólido	54
4.2.10 Determinação da configuração absoluta de aminoácidos das pseudovibriamidas	60
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1 Mapa genômico de <i>P. brasiliensis</i> Ab134	61
5.2 Busca pelo BGC das dibromotirosinas no genoma de <i>P. brasiliensis</i> Ab134	64
5.3 Análises de bioinformática do NRPS-PKS BGC de <i>P. brasiliensis</i> Ab134 ...	66
5.4 Desenvolvimento dos mutantes <i>pppA</i> e <i>pppD</i> e detecção dos produtos de biossíntese do <i>ppp</i> BGC	73
5.5 Bioensaios de motilidade bacteriana (<i>swarming</i> e <i>swimming</i>), produção de surfactantes e formação de biofilme para <i>P. brasiliensis</i> Ab134 WT e mutantes <i>pppA</i> e <i>pppD</i>	77
5.6 Avaliação de metodologias de cultivo e extração para isolamento de compostos produzidos por <i>P. brasiliensis</i> Ab134.....	82
5.7 Estratégias para o isolamento das pseudovibriamidas	84
5.8 Determinação estrutural da pseudovibriamida A1	85
5.9 Análises de bioinformática dos domínios do <i>ppp</i> BGC responsáveis pela biossíntese da pseudovibriamida A1 por <i>P. brasiliensis</i> Ab134	92

5.10	Determinação estrutural da pseudovibriamida A2.....	101
5.11	Determinação estrutural da pseudovibriamida A3.....	107
5.12	Determinação estrutural da pseudovibriamida A4.....	109
5.13	Determinação estrutural das pseudovibriamidas A5-6.....	111
5.14	Determinação da estrutural da pseudovibriamida B1.....	113
5.15	Determinação da estrutural das pseudovibriamidas B2-3.....	121
5.16	Determinação da estrutural da pseudovibriamida B4.....	123
5.17	Determinação da estrutural das pseudovibriamidas B5-6.....	125
5.18	Desenvolvimento dos mutantes <i>pppH</i> , <i>pppl</i> e <i>pppH</i> , e detecção de intermediários de biossíntese do <i>ppp</i> BGC.....	127
5.19	Considerações sobre a biossíntese das pseudovibriamidas.....	130
6	CONCLUSÃO	132
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	134
8	APÊNDICE.....	145

1 INTRODUÇÃO

1.1 A pesquisa de produtos naturais de microrganismos

Os produtos naturais (PNs), também conhecidos como metabólitos especializados, são moléculas com uma enorme diversidade química estrutural (KATZ; BALTZ, 2016), muitas vezes com propriedades semelhantes à de medicamentos (NEWMAN; CRAGG, 2020). Em meados do século XIX, os PNs de origem microbiana se destacaram pelo seu potencial farmacológico, não somente como antibióticos (penicilina, estreptomicina, tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina, vancomicina e rifamicina), mas também como imunomoduladores (rapamicina e ciclosporina) e redutores de colesterol (estatinas) (MILSHTEYN; SCHNEIDER; BRADY, 2014). Ainda hoje os PNs são uma aposta promissora para o desenvolvimento de fármacos, sendo que mais de 30% dos medicamentos atualmente no mercado são PNs ou derivados e outros 35% mimetizam a interação desses compostos com o alvo biológico (Figura 1.1) (NEWMAN; CRAGG, 2020).

Figura 1.1 – Origem dos fármacos aprovados entre 1981-2019 (n = 1394).

Fonte: Adaptado de Newman e Cragg (2020). Legenda – N: produtos naturais inalterados, NB: mistura de compostos de plantas, ND: derivados de produtos naturais, S: compostos sintéticos, S*: compostos sintéticos baseado em modelo farmacofórico de PN, /NM: composto que mimetiza um PN.

Atualmente os pesquisadores de PNs concentram esforços para acelerar a identificação de PNs inéditos, preferencialmente com potencial farmacológico. A

aquisição e análise de dados de genômica, metabolômica e transcriptômica, possibilitam estudos de sistemas complexos que abordam questões mais fundamentais da biossíntese e ecologia química, visando entender a evolução e a função de metabólitos produzidos por microrganismos, assim como o seu papel na adaptação à nichos ecológicos dos organismos produtor e hospedeiro (BERGEIJK et al., 2020).

1.2 Biossíntese de produtos naturais

Entre as décadas de 70 e 80 surgiram as primeiras evidências da existência de genes responsáveis pela produção de PNs. Já em meados da década de 90, o desenvolvimento das tecnologias de sequenciamento de genomas provocou um grande impacto na área (ZIEMERT; ALANJARY; WEBER, 2016), dada a observação que a capacidade metabólica dos organismos até então estudados era muito maior do que a expressa em condições de laboratório (KATZ; BALTZ, 2016; MILSHTEYN; SCHNEIDER; BRADY, 2014; VAN BERGEIJK et al., 2020). A diminuição dos custos para a aquisição de dados genômicos e a criação de inúmeras ferramentas de bioinformática tornaram o estudo de genes envolvidos na biossíntese cada vez mais presente (REN; SHI; ZHAO, 2020; VAN DER HOOFT et al., 2020).

Na maioria dos casos, os genes necessários para montar, modificar, dar resistência ao organismo produtor, regular a produção e o transporte do PN, estão agrupados no genoma, estabelecendo um agrupamento gênico de biossíntese (*biosynthetic gene cluster*, BGC) (MOUNCEY et al., 2019). Essa característica permite não apenas a diversificação de um mesmo esqueleto de carbono, mas também a rápida transferência e aquisição de novos BGCs entre (micro)organismos. As enzimas envolvidas na biossíntese de PNs foram selecionadas durante um longo processo evolutivo, de maneira a adaptar-se e estabelecer sua especificidade (JENSEN, 2010; SCOTT; PIEL, 2019). A manutenção de um determinado BGC constitui uma vantagem adaptativa ao organismo que o possui, pois regulam e expressam a biossíntese de metabólitos relevantes para a dinâmica das interações entre organismos (MCFALL-NGAI et al., 2013; MOUNCEY et al., 2019; PHELAN et al., 2012; SCOTT; PIEL, 2019; HOOFT et al., 2020).

Atribuir um BGC ao produto de sua expressão, assim como investigar os mecanismos enzimáticos para a sua formação, tornaram-se ferramentas auxiliares para o desenvolvimento de novas moléculas bioativas (RAY; MOORE, 2016). O desenvolvimento da instrumentação analítica e para o processamento de grandes conjuntos de dados, permitiram identificar PNs minoritários e em misturas complexas, assim como caracterizar variações estruturais derivadas de rotas biossintéticas associadas (PUCKETT et al., 2020; HOOFT et al., 2020).

Os PNs microbianos podem ser classificados como policetídeos, peptídeos (ribossomais ou não-ribossomais), terpenos, alcaloides, ou de biossíntese mista. A modularidade das policetídeo sintases (PKS) e peptídeos não-ribossomais sintetases (NRPS), possibilitam a eventual predição da estrutura do metabólito biossintetizado, considerando-se a presença e especificidade de cada domínio enzimático.

A maquinaria enzimática das PKS é responsável pela produção de macrolactonas, polienos, compostos aromáticos, decalinas e poliéteres (WALSH; TANG, 2017). A diversidade dos policetídeos é gerada pela ação sequencial de módulos enzimáticos (Figura 1.2A), encarregados pela condensação (cetosintase, KS) de unidades precursoras e extensoras selecionadas (acetil transferase, AT) e subsequentes reações redutoras opcionais (cetoreductase, KR; desidrogenase, DH e enoilreductase, ER; Figura 1.2B). As PKS ainda podem ser diversificadas dada a presença de metiltransferases, glicosiltransferases, monooxigenases, peroxidases, halogenases, assim como enzimas oxiredutoras capazes de rearranjar o esqueleto de carbono originalmente formado pela PKS (HERTWECK, 2009, 2015).

De maneira equivalente (Figura 1.2C), as NRPS evoluíram de modo a produzir peptídeos dada a ativação e seleção de aminoácidos pelo domínio de adenilação (A), que são unidos via ligação peptídica catalisada pelo domínio de condensação (C) (FISCHBACH; WALSH, 2006). Até então, mais de 200 aminoácidos foram descritos como monômeros das NRPS, e, assim como as PKS, outras enzimas podem atuar e modificar o esqueleto peptídico, assegurando um grande potencial biossintético para a produção das mais diferentes estruturas (WALSH; TANG, 2017).

A especificidade dos domínios de A é determinada por um conjunto de aproximadamente 10 aminoácidos, em um sítio de ligação localizado entre os subdomínios N- e C-terminal. A ativação do resíduo de aminoácido desencadeia uma alteração de orientação, na qual o subdomínio C-terminal rotaciona 180°, permitindo

o acesso ao sítio ativo do domínio de tioração (ou proteína carreadora de peptídeo, PCP) vizinho (CHALLIS; RAVEL; TOWNSEND, 2000; PAYNE et al., 2017). Por sua vez, a PCP também possui mobilidade suficiente para acessar o sítio ativo do domínio de C (PAYNE et al., 2017).

O domínio de C é um dímero, no qual o sítio ativo se encontra no centro de um canal (Figura 1.2D). No início desse canal há um motivo enzimático (*motif*) conservado HHxxxDG, essencial para a formação da ligação peptídica (PAYNE et al., 2017; STACHELHAUS et al., 1998). Este domínio também pode apresentar outras atividades catalíticas, sendo responsável por catalisar reações de ciclização (C_y , *motif* DxxxxDxxS) (DOWLING et al., 2016), epimerização (C_{DUAL} , *motif* HHI/LxxxxGD) (BALIBAR; VAILLANCOURT; WALSH, 2005; RAUSCH et al., 2007) ou mesmo a formação de β -lactamas ($C_{\beta\text{-lactam}}$, *motif* HHHxxxDG) (GAUDELLI; LONG; TOWNSEND, 2015), ampliando ainda mais a diversidade dos peptídeos de origem não-ribossomal.

Figura 1.2 – Organização dos domínios enzimáticos das PKS (A e B) e NRPS (C e D).

Fonte: A-C, adaptado de Fischbach e Walsh (2006); D, adaptado de Payne et al (2017).

1.3 Esponjas marinhas e o microbioma associado

Dentre os organismos eucariotos, as esponjas marinhas se destacam por serem consideradas fósseis vivos. Estima-se que seus primeiros espécimes tenham surgido há cerca de 600 milhões de anos, e, portanto, evoluíram e continuam a prosperar em eras dominadas por microrganismos. É o invertebrado marinho dominante em recifes de corais, sendo encontradas nos mais diversos ambientes aquáticos, marinho ou de água doce, desde águas tropicais a regiões polares (HENTSCHEL et al., 2012).

Por serem animais sésseis, filtradores e de morfologia simples, as esponjas marinhas acumulam defesas químicas contra predadores e microrganismos invasores. A microbiota de uma esponja marinha pode corresponder a mais de um terço de sua biomassa, contendo uma complexa diversidade filogenética, como Archea, cianobactérias, bactérias heterotróficas, fungos, diatomáceas e dinoflagelados (Figura 1.3) (ALEX et al., 2013; HENTSCHEL et al., 2012; PITA et al., 2018; THOMAS et al., 2016).

Pouco se conhece sobre a evolução da diversidade e especificidade de microrganismos associados à esponjas e dos mecanismos que influenciam essa associação (HENTSCHEL et al., 2012; PITA et al., 2018; TAYLOR et al., 2007). Considera-se que a grande diversidade da microbiota seja responsável pelo fornecimento, transporte e reciclagem de nutrientes, como carbono, nitrogênio e enxofre, além de auxiliar na defesa química e estruturação funcional das esponjas marinhas (TAYLOR et al., 2007). Questões chave para o entendimento da ecologia e evolução de ambos os organismos ainda sem resposta incluem como e quando essa associação se iniciou, qual é a dinâmica da comunidade microbiana, como ela influencia para a saúde da esponja marinha, e como ela afeta o ecossistema em que estão inseridos (ALEX et al., 2013; HENTSCHEL et al., 2012; PITA et al., 2018; TAYLOR et al., 2007; THACKER; FREEMAN, 2012; THOMAS et al., 2016).

A hipótese mais aceita é de que a microbiota das esponjas marinhas é uma mistura de microrganismos generalistas e especialistas, relativamente estável, e que pode ser transmitida vertical ou horizontalmente. Análises de rRNA 16S suportam duas hipóteses de evolução: i) a associação ocorreu antes da especiação das esponjas marinhas atuais, assumindo-se que existiu um ancestral comum já

associado a certos microrganismos, os quais foram transmitidos verticalmente, e/ou ii) microrganismos que foram(são) capazes de colonizar uma esponja marinha, também foram(são) capazes de viver livremente, e desse modo puderam(podem) se disseminar e colonizar outras esponjas marinhas (transmissão horizontal). Além disso, observou-se que muitas vezes a comunidade microbiana presente na água do mar é diferente da encontrada nesses invertebrados, mesmo quando as amostras são coletadas concomitantemente. Outros estudos ainda demonstraram que as esponjas marinhas “consomem” a microbiota da água do mar ao menos 2 vezes mais rápido do que a microbiota associada à esponjas, sugerindo que as esponjas marinhas podem “reconhecer” bactérias associadas (HENTSCHEL et al., 2012; TAYLOR et al., 2007).

Figura 1.3 – Diversidade da comunidade microbiana em esponja marinha, considerando dados do banco de dados Global Sponge Microbiome (A), e sequências de rRNA 16S em amostras individuais (B e C). Em B, amostras de esponja marinha são representadas em laranja, de água do mar em azul e de sedimentos em marrom. Gráfico de dissimilaridade Bray-Curtis das amostras individuais presentes em B; símbolos coloridos representam amostras de esponja marinha, círculo preto/branco amostras da água de mar e asterisco representa amostra de sedimento (C).

Fonte: Pita, et al., 2018 (A) e Thomas, et al., 2016 (B e C).

Diferenciar microrganismos facultativos, que toleram as condições da água do mar, mas preferencialmente habitam esponjas marinhas, de microrganismos “acumulados”, que perduram tempo suficiente para serem detectados pelas análises ainda é um desafio, assim como desvendar os mecanismos responsáveis pela dinâmica do holobionte desses invertebrados (HENTSCHEL et al., 2012; TAYLOR et al., 2007).

Com o desenvolvimento das ferramentas ômicas, essa associação começou a ser estudada em mais detalhe. Organismos antes vistos como autônomos, apenas regulados pelo seu próprio genoma, têm se mostrado susceptíveis a variações fenotípicas de acordo com o microbiota associada (CHU et al., 2019; GUO et al., 2019; MORTON et al., 2019). Deste modo, supõe-se que a aquisição, evolução e produção de metabólitos especializados também foi influenciada por essas interações, podendo atuar em diferentes níveis de regulação e manutenção de ecossistemas (CRAWFORD; CLARDY, 2011; MCFALL-NGAI et al., 2013; PHELAN et al., 2012).

No caso de PNs obtidos a partir de esponjas marinhas, alguns já foram atribuídos como produtos de biossíntese de microrganismos (Figuras 1.4-1.6) (HENTSCHEL et al., 2012; MCCAULEY et al., 2020; STILL et al., 2014). Destaca-se os PNs, originalmente obtidos a partir de esponjas marinhas, mas que também foram produzidos em meio de cultura tanto por bactérias isoladas de ambientes marinhos (manzamina A, éteres difenílicos polibromados, toyocamicina e dibromotirosinas), como de ambientes terrestres (bengamida E, andrimida, microsclerodermina D, demetilincisterol, nazumamida A e bacteriohopaneterol) (Figura 1.4) (HENTSCHEL et al., 2012; STILL et al., 2014). Apesar da origem de alguns desses microrganismos não ser a esponja marinha do qual o PN foi também obtido, esses exemplos sustentam a hipótese de rotas biossintéticas similares presente em diferentes ecossistemas, possivelmente devido a presença de microrganismos associados.

Outros estudos (Figura 1.5) também mostraram que swinholid A e a 13-demetilisodisidenina estão localizadas em células microbianas. Já análises de metagenoma e filogenia apontaram que o BGC da psimberina, da theopalauamida, da onnamida A, da placortina, da caliculina A, do pelorusídeo A e da pateamina A são de origem bacteriana (HENTSCHEL et al., 2012; STILL et al., 2014).

Outros PNs previamente obtidos de esponjas marinhas, como o jasplaquinolídeo, a salicilhalamida A, a latrunculina A e a renieramicina A (Figura 1.6)

tem esqueletos de carbono similares a PNs produzidos em meio de cultura por microrganismos ou mesmo detectado no metagenoma de outros invertebrados (STILL et al., 2014), sugerindo que esses PNs possuem origem microbiana. Acredita-se que essa associação amplia o repertório químico das esponjas marinhas (HENTSCHEL et al., 2012).

Figura 1.4 – Produtos naturais isolados a partir de esponjas marinhas e a partir do meio de cultivo de microrganismos do ambiente marinho (azul) ou terrestre (vermelho).

Fonte: Autoria própria.

Figura 1.5 – Produtos naturais isolados a partir de esponjas marinhas e detectados por técnicas de hibridização (azul) ou que tiveram o *gene cluster* responsável pela biossíntese de compostos detectado em amostras de metagenoma (vermelho).

Fonte: Autoria própria.

Figura 1.6 – Produtos naturais com esqueletos de carbono similares isolados a partir de esponjas marinhas (azul) e produzidos em cultura por microrganismos (vermelho) ou detectados em análises de metagenoma (preto).

Fonte: Autoria própria.

1.4O gênero *Pseudovibrio*

O filo das Proteobactérias é o mais abundante no microbioma das esponjas marinhas, principalmente γ - e α -Proteobactérias (Figura 1.3) (PITA et al., 2018). Dentre essas linhagens, *Pseudovibrio* spp. é consistentemente detectada e isolada de esponjas marinhas dos mais diversos gêneros, mas nunca encontrada simultaneamente na água do mar em volta desses indivíduos (VERSLUIS et al., 2018).

Pseudovibrio spp. é apenas encontrada em esponjas marinhas saudáveis (SWEET; BULLING; CERRANO, 2015), podendo também inibir o crescimento de patógenos desses invertebrados (CROWLEY et al., 2014; RAINA et al., 2016). Linhagens desse gênero já foram isoladas a partir de larvas da esponja marinha *Mycale laxissima*, indicando que essa bactéria pode ser transmitida verticalmente (ENTICKNAP et al., 2006). Tais evidências sugerem que *Pseudovibrio* spp. seja um verdadeiro simbiote das esponjas marinhas (ESTEVES; CULLEN; THOMAS, 2017).

A primeira linhagem de *Pseudovibrio* foi descrita há menos de 2 décadas, como heterotrófica, anaeróbica facultativa, capaz de desnitrificação, e que requer ao menos 3% de sais para cultivo (SHIEH; LIN; JEAN, 2004). O gênero pertence à classe das α -Proteobactérias (família *Rhodobacteraceae*), são Gram-negativas, na forma de bastonete com um flagelo axial (SHIEH; LIN; JEAN, 2004). Atualmente 5 espécies foram reportadas: *P. denitrificans* (SHIEH; LIN; JEAN, 2004), *P. ascidiaceicola* (FUKUNAGA et al., 2006), *P. japonicus* (HOSOYA; YOKOTA, 2007), *P. axinellae* (O'HALLORAN et al., 2011) e *P. brasiliensis* (FRÓES et al., 2018).

Estudos de filogenia recentes reclassificaram duas espécies primeiramente consideradas como *Pseudovibrio*, *P. hongkongensis* (XU et al., 2015) e *P. stylochi* (ZHANG et al., 2016) como um novo gênero, nomeado *Polycladidibacter* (HINGER et al., 2020). *Po. hongkongensis* e *Po. stylochi* apresentam um genoma de aproximadamente 3,7 Mb, consideravelmente menores que os genomas de *Pseudovibrio* spp., maiores que 5 Mb (HINGER et al., 2020).

As linhagens classificadas como *Pseudovibrio* spp. apresentam grande versatilidade metabólica e ecológica, justificando sua presença em águas abertas (*free-living*), ou associada a um hospedeiro, como esponjas marinhas, corais e tunicados (Figura 1.7). Esse gênero também pode codificar uma grande diversidade de proteínas efetoras que auxiliam na associação e interação com o organismo hospedeiro (ALEX; ANTUNES, 2015, 2018; BONDAREV et al., 2013; NAUGHTON et al., 2017; ROMANO, 2018; ROMANO et al., 2014, 2016; SCHWEDT et al., 2015; VERSLUIS et al., 2018). Análises genômicas detectaram a presença de “ilhas” em todos os membros do gênero, indicando a aquisição de novas características genéticas através de transferência horizontal de genes, o que também mostra a plasticidade desses genomas, e justifica a ausência de especiação de acordo com o hospedeiro (Figura 1.8) (ALEX; ANTUNES, 2018; VERSLUIS et al., 2018). Por outro

lado, observou-se um certo grau de homogeneidade do arsenal genético entre a maioria das linhagens associadas a esponjas marinhas e a corais, quando comparadas com linhagens isoladas de tunicados, sugerindo uma adaptação de acordo com o invertebrado (ALEX; ANTUNES, 2018).

Figura 1.7 – Representação esquemática da detecção de *Pseudovibrio* spp., contabilizando métodos dependentes e independentes e cultivo, em diferentes nichos ecológicos, considerando-se distribuição geográfica (A), frequência de detecção (B) e abundância relativa de sequências de rRNA 16S em comunidades bacterianas (C).

Fonte: Romano, 2018. Tradução dos termos em inglês – *sediments*: sedimentos; *sea cucumbers*: pepinos do mar; *bryozoa*: briozoários; *sponges*: esponjas marinhas; *corals*: corais; *tunicates*: tunicados; *flatworms*: platelmintos; *algae*: algas; *jellyfishes*: medusas/água-vivas; *crabs*: caranguejos; *worms*: vermes; *shrimps*: camarões; *seawater*: água do mar; *biofilm*: biofilme; *oil*: zomas de extração de petróleo; *wastewater*: águas residuais; *clams*: mexilhões; *wetlands*: pântanos; *others*: outros; *relative abundance*: abundância relativa.

Figura 1.8 – Comparação filogenética (A) e detecção de sequências de rRNA 16S de diferentes espécies de *Pseudovibrio* spp. de acordo com o nicho ecológico (B).

Fonte: Alex e Antunes, 2018 (A) e Versluis, et al., 2018 (B). Tradução dos termos em inglês – *associated*: associado; *sponges*: esponjas marinhas; *tunicates*: tunicados; *corals*: corais; *free-living*: águas abertas; *flatworms*: platelmintos; *sea squirt*: ascídias; *symbiont*: simbiote; *marine*: ambiente marinho; *aquatic*: ambiente aquático; *database detected*: detecção em base de dados.

Pseudovibrio spp. apresenta-se como um candidato ideal para o estudo de mecanismos necessários para colonizar um amplo espectro de hospedeiros (ALEX; ANTUNES, 2018; ROMANO, 2018). Além disso, a presença de genes que codificam para a biossíntese de PNs demonstra a capacidade metabólica do gênero (NAUGHTON et al., 2017). Exemplos de PNs isolados a partir do cultivo de linhagens de *Pseudovibrio* spp. (Figura 1.9, e dibromotirosinas apresentadas na Figura 1.4) ilustram a versatilidade metabólica de *Pseudovibrio* spp. (CHOUDHARY et al., 2018;

HARRINGTON et al., 2014; NICACIO et al., 2017; PENESYAN et al., 2011; RAINA et al., 2016; RODRIGUES et al., 2017; SERTAN-DE GUZMAN et al., 2007; VIZCAINO, 2011; WANG et al., 2015).

Figura 1.9 – Produtos naturais produzidos em meio de cultura por linhagens de *Pseudovibrio* spp.

Fonte: Autoria própria.

1.5 Motilidade bacteriana e formação de biofilme

O comportamento coletivo é uma característica comum entre vários sistemas biológicos e contribui para a sobrevivência das espécies envolvidas (WHITELEY; DIGGLE; GREENBERG, 2017). No entanto, pouco se sabe sobre a sua regulação,

destacando-se a necessidade de investigar sistemas biológicos em que a conexão entre o fenótipo observado e seus mecanismos moleculares possam ser comprovados e avaliados. A rápida multiplicação e reprodução de bactérias em eventos de comportamento coletivo, como motilidade e formação de biofilme, aliado a manipulação genética desses microrganismos, faz desse sistema um importante objeto de estudo (MATTINGLY et al., 2018).

Apesar da motilidade flagelar ser antagonista à formação de biofilme, ambos contribuem para que as bactérias se desenvolvam em um ambiente e/ou colonizem hospedeiros, estabelecendo uma associação para com o nicho ecológico (GUTTENPLAN; KEARNS, 2013; VERSTRAETEN et al., 2008). A escolha entre ser móvel ou sésil pode ser vital para as bactérias, e é diretamente influenciada por fatores ambientais, como disponibilidade de nutrientes, temperatura, umidade e presença de toxinas e antibióticos (GUTTENPLAN; KEARNS, 2013; HARSHEY, 2003; KEARNS, 2010; MATTINGLY et al., 2018).

Sabe-se que as bactérias podem apresentar cinco mecanismos de motilidade (Figura 1.10): *swimming*, *swarming*, *twitching*, *gliding* e *sliding*. Define-se como *swimming* o movimento de células individuais, promovido pela rotação de flagelo em líquidos. *Swarming* é o movimento rápido e coordenado em superfícies sólidas, também impulsionado por flagelos. Quando o movimento é resultado do prolongamento e retração de pilus, denomina-se *twitching*. Na ausência dessas extensões, pode-se observar os fenômenos de *gliding* e *sliding*, sendo o primeiro um modo de translocação ativo (uso de pontos de adesão-focal), e o segundo, passivo, ou seja, difusão por crescimento (HARSHEY, 2003; KEARNS, 2010; MATTINGLY et al., 2018).

Biofilmes são agregados celulares organizados e complexos, com uma alta densidade celular. São definidos como uma forma de vida não móvel, dada a sua adesão à uma superfície via polímeros extracelulares (FLEMMING et al., 2016; HARSHEY, 2003). Esses agregados fornecem abrigo, acumulação de nutrientes e facilitam comunicação entre as células, sendo encontrados associados a todos os organismos superiores, e são principalmente associados a casos de patogenicidade, como infecções em plantas e humanos, assim como contaminação de materiais hospitalares (FLEMMING et al., 2016).

Figura 1.10 – Mecanismos de motilidade de bactérias, destacando-se os filos/classes em que esses mecanismo já foram descritos.

Fonte: Adaptado de Kearns 2010.

Apesar dos fenótipos de motilidade bacteriana e biofilme terem sido descritos há muito tempo, pouco se sabe como são regulados, e quais cascatas de transdução de sinais são utilizadas para a sua regulação (MATTINGLY et al., 2018).

2 JUSTIFICATIVA

A investigação do microbioma cultivável associado a esponjas marinhas do litoral brasileiro tem sido objeto de estudo contínuo pelo grupo do Prof. Berlinck há mais de uma década (IÓCA et al., 2016; IÓCA; NICACIO; BERLINCK, 2018; KOSSUGA et al., 2012; PASSARINI et al., 2013; RUA et al., 2014, 2018; TRINDADE-SILVA et al., 2012, 2013). Nesse contexto, o isolamento da α -Proteobactéria *Pseudovibrio brasiliensis* Ab134, associada a esponja *Arenosclera brasiliensis* (FRÓES et al., 2018; RUA et al., 2014), levou a descoberta da produção de derivados das dibromotirosinas em meio de cultura, alcaloides anteriormente obtidos apenas de esponjas marinhas (NICACIO et al., 2017).

O interesse por bactérias pertencentes ao gênero *Pseudovibrio* tem aumentado nos últimos anos, dada a sua capacidade de inibir o crescimento de patógenos de invertebrados marinhos (CROWLEY et al., 2014; RAINA et al., 2016) e seu potencial biossintético verificado por análises genômicas (NAUGHTON et al., 2017). O conjunto dessas informações levou à hipótese de que *Pseudovibrio* spp. seja um verdadeiro simbionte de esponjas marinhas, entretando, detalhes sobre essa associação ainda permanecem desconhecidos (VERSLUIS et al., 2018).

No caso do presente estudo, análises preliminares do genoma de *P. brasiliensis* Ab134 indicaram a presença de um NRPS-PKS BGC pertencente a uma família de BGCs conservada no gênero *Pseudovibrio*, e, também presente em algumas linhagens de *Pseudomonas*. Enquanto *Pseudovibrio* spp. é restrito ao ambiente marinho, *Pseudomonas* spp. é ubíqua e foi isolada de vários hospedeiros eucarióticos, incluindo fungos, plantas e animais (PEIX; RAMÍREZ-BAHENA; VELÁZQUEZ, 2018).

A presença de um mesmo BGC em bactérias de ecossistemas distintos sugere que os metabólitos oriundos de sua expressão podem desempenhar funções adaptativas. Desta forma, o estudo da rota biossintética do NRPS-PKS BGC em *P. brasiliensis* Ab134 objetiva ampliar o conhecimento quanto aos PNs possivelmente envolvidos nas interações entre micro- e macrorganismos.

3 OBJETIVOS

O objetivo geral deste projeto foi estudar a biossíntese de metabólitos possivelmente envolvidos na motilidade da α -Proteobactéria marinha *Pseudovibrio brasiliensis* Ab134, associada à esponja marinha *Arenosclera brasiliensis*, utilizando-se dados de sequenciamento do genoma, ferramentas moleculares para inativação de genes e técnicas tradicionais de cultivo em laboratório, tendo como objetivos específicos:

- a) Sequenciar o genoma de *P. brasiliensis* Ab134.
- b) Avaliar o potencial biossintético de *P. brasiliensis* Ab134 utilizando ferramentas de bioinformática.
- c) Desenvolver metodologia para deleção de genes via recombinação homóloga em *P. brasiliensis* Ab134.
- d) Avaliar o perfil metabólico produzido em meio de cultura dos mutantes gerados utilizando-se de técnicas cromatográficas e espectrométricas.
- e) Avaliar o fenótipo dos mutantes gerados em bioensaios de motilidade bacteriana: *swarming*, *swimming* e formação de biofilme.
- f) Realizar anotação genética funcional de genes essenciais para a produção dos compostos de interesse, neste caso, o NRPS-PKS BGC conservado entre várias cepas *Pseudovibrio* spp..
- g) Realizar experimentos de cultivos para isolamento dos compostos de interesse.
- h) Determinar a estrutura dos compostos de interesse utilizando-se de técnicas espectrométricas e espectroscópicas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Equipamentos e generalidades

4.1.1 Espectrometria de massas

Análises por cromatografia líquida acoplada a detectores por arranjo de diodos, de espalhamento de luz e de espectrometria de massas (HPLC-PDA-ELSD-MS/ESI) foram realizadas em sistema constituído por um cromatógrafo líquido de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) Waters, modelo Alliance 2695, acoplado a um detector espectrofotométrico (*Photodiode Detector Array*, PDA) UV-Visível Waters, modelo 2696, com varredura entre os comprimentos de onda ($\lambda_{\text{máx}}$ 200 – 800 nm); conectado a um detector evaporativo de espalhamento de luz (*Evaporative Light Scattering Detector*, ELSD) Waters, modelo 2424, otimizado para: *gain* de 100, pressão do gás (N_2) à 50 psi, aquecimento à 80 °C e nebulizador à 36 °C, 60 %; e a um espectrômetro de massas (*Mass Spectrometry*, MS) Waters, modelo Micromass ZQ2000, com os parâmetros da fonte de ionização nas seguintes condições: voltagem do capilar de 3,0 kV, temperatura da fonte à 100 °C, temperatura de dessolvatação à 350 °C, operando em modo de ionização por *eletrospray* (*Electrospray Ionization*, ESI) positivo e negativo de 300 à 1500 Da, fluxo de gás no cone em 50 L/h e dessolvatação em 350 L/h. Os detectores são gerenciados por um sistema Empower 2.0. A menos que especificado, análises foram realizadas utilizando-se uma coluna de fase reversa Waters C₁₈ X-Terra (4,6 x 250 mm, 5 μm), com gradiente linear de H₂O (A) e CH₃OH/MeCN 1:1 (B), ambos acidificados com 0,1% de ácido fórmico (FA).

Análises por espectrometria de massas de alta resolução (UPLC-QTOF-MS/MS) foram realizadas em sistema composto por um cromatógrafo líquido de ultra eficiência (*Ultra Performance Liquid Chromatography*, UPLC) Waters, modelo Acquity UPLC H-class, acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução quadrupolar e tempo de voo (*Quadrupole-Time of Flight Mass Spectrometry*, QTOF-MS) Waters Xevo G2-XS QTOF, com ionização por *electrospray* (ESI) em modo positivo, detector otimizado para os parâmetros: voltagem do capilar de 1,2 kV, voltagem do cone de 30 V, temperatura da fonte à 100 °C, temperatura de

dessolvatação à 450 °C, fluxo de gás (N₂) no cone de 50 L/h e dessolvatação de 750 L/h, varrendo de 200 à 1500 Da, intervalo de varredura de 0,2 s, energia de colisão de 30-50 V. Para calibração interna utilizou-se uma solução de leucina-encefalina (20 µg/mL, Sigma-Aldrich®), infundida pela sonda do *lock-mass* com vazão de 10 µL/min. A menos que especificado, análises foram realizadas utilizando uma coluna de fase reversa BEH C₁₈ (2,1 × 100 mm × 1,7 µm, Waters), mantida à 40 °C, em gradiente de H₂O (A) e MeCN (B), ambas acidificados com 0,1% de ácido fórmico. As amostras a serem analisadas foram mantidas à 15 °C.

Análise de fragmentação de peptídeos consideraram a nomenclatura que representa a formação de íons fragmentos contendo uma carga positiva no lado N-terminal (**a**, **b** ou **c**) e outra no lado C-terminal (**x**, **y** ou **z**), como apresentado na Figura 4.1 (CANTÚ et al., 2008).

Figura 4.1 – Esquema de fragmentação apresentando a nomenclatura proposta por Roepstorff-Fohlmann-Biemann dos fragmentos formados para um tripeptídeo hipotético.

Fonte: Autoria própria.

Análises por espectrometria de massas com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisador de tempo de voo (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight*, MALDI-TOF) foram realizadas em um espectrômetro de massas Autoflex Speed LRF (Bruker Daltonics), equipado com um laser Smartbeam™-II (355 nm). Para calibração externa utilizou-se uma solução de peptídeos padrão (Pepmix, Bruker Daltonics). As análises foram realizadas em modo *reflectron* positivo, detector otimizado para 1000 disparos aleatórios, com tempo de retardo de extração de íons de 9297 ns; tensão da fonte de íons 1 de 19 k; tensão na fonte de íons 2 de 16,55 kV; tensão de lentes de 8,3 kV; varrendo de 400 à 3500 Da.

Para análises por *dried-droplet* (DD), uma mistura de 1:1 de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA, Sigma-Aldrich) e ácido 2,5-dihidroxibenzóico (DHB, Sigma-Aldrich), solubilizada em 78:22 MeCN/H₂O + 0,1% TFA, foi utilizada como matriz universal. As amostras foram diluídas em MeOH e 1 μ L da amostra foi misturada a 2 μ L de matriz universal. 1 μ L dessa mistura foi aplicado à placa de MALDI (Bruker Daltonics, Billerica, MA) e deixado secar ao ar ambiente. Para análises por imageamento por espectrometria de massas (*imaging mass spectrometry*, IMS), a amostra foi transferida para uma placa MALDI MSP (Bruker Daltonics, Billerica, MA). Uma mistura de 1:1 CHCA/DHB recristalizados foi aplicada utilizando-se uma peneira de aço com poro de 53 μ m (Hogentogler & Co., Inc., Columbia, MD). A amostra foi dessecada em uma estufa à 37°C por 5 h. Fotos foram documentadas, antes e após o processo de dessecagem. Os dados de IMS foram adquiridos em modo *reflectron* positivo, com um intervalo de 500 μ m de distância entre os disparos aleatórios como descrito anteriormente (YANG et al., 2012). Os dados foram obtidos e processados pelo software flexControl v. 3.4.135.0 (Bruker Daltonics) e analisados pelos softwares flexAnalysis v. 3.4 (DD) e flexImaging v. 4.0 (IMS).

4.1.2 Ressonância magnética nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram obtidos utilizando-se um equipamento Bruker Advance III (14,1 T), operado a 600 MHz na frequência do hidrogênio (¹H) e a 150 MHz na frequência do carbono (¹³C), ou em um equipamento Bruker AVII (21,1 T), operado a 900 MHz na frequência do hidrogênio (¹H) e a 226 MHz na frequência do carbono (¹³C). As amostras foram preparadas em solventes deuterados da marca Cambridge Isotopes Laboratories Inc. Os dados foram obtidos e processados pelo software TopSpin v. 2.1 e 3.5 pl 7 para aquisição, e 4.0.7 para processamento.

4.1.3 Fracionamento cromatográfico

Quatro sistemas de HPLC foram utilizados para os fracionamentos: 1) HPLC semipreparativo Thermo Spectra composto por uma bomba de gradiente quaternário, acoplado a um detector UV e coletor automático; 2) HPLC Agilent 1260, composto por

uma bomba de gradiente quaternário, acoplada a um detector UV e amostrador automático, gerenciados por um sistema OpenLab; 3) HPLC preparativo Waters composto por uma bomba de gradiente quaternário (modelo 2535), um detector UV/Visível (modelo 2489) e um detector evaporativo com espalhamento de luz (modelo 2424), gerenciados por um sistema Empower 3.0; e 4) HPLC analítico Waters, composto por uma bomba para gradiente quaternário Waters (modelo 600 *Controller*) e um detector UV (modelo 2487 *Dual λ absorbance*), gerenciados por um sistema Millennium³².

4.1.4 Solventes

Os solventes utilizados para procedimentos de extração, cromatografia em coluna pré-empacotada e limpeza de resinas foram de grau analítico (Synth).

Em metodologias de HPLC foram utilizados solventes de grau cromatográfico (AppliChem Panreac, Sigma-Aldrich®, Honeywell – Riedel-de-Haen, J.T. Baker, Fisher Chemical) e água destilada e purificada em um sistema Milli-Q Millipore equipado com resina de troca iônica e filtro biológico.

Os solventes utilizados para análises por UPLC-QTOF-MS/MS foram de grau MS (Sigma-Aldrich®, AppliChem Panreac, Fisher Chemical).

A água destilada utilizada para preparo de meio de cultura foi preparada por um sistema de osmose reversa TE-4007-10 Tecnal.

4.1.5 Sequenciamento de genoma

O genoma em estudo foi sequenciado utilizando-se as tecnologias Illumina e Oxford Nanopore. O DNA genômico foi preparado utilizando-se o kit Illumina Nextera XT DNA *library* e o sequenciamento realizado em um sistema Illumina NextSeq 500, utilizando-se *2x150 paired-end reads*. Para o sequenciamento utilizando-se a tecnologia Oxford Nanopore, o DNA genômico foi preparado utilizando-se o protocolo 1D *library* Oxford Nanopore, e realizado em uma SpotON *flow cell*, no instrumento Oxford Nanopore MinION. O genoma sequenciado por tecnologia Oxford Nanopore foi montado utilizando o softwar Spades, e a montagem refinada utilizando-se os dados de sequenciamento Illumina. Todos esses procedimentos foram realizados pelo

Research Resources Center, Sequencing Core, da University of Illinois at Chicago (RRC-UIC).

4.1.6 Análises de bioinformática

Após a montagem do genoma, os genes (*open reading frames*, ORF) foram preditos pelo software Glimmer (DELCHER et al., 2007).

O genoma também foi analisado por antiSMASH 5.1.0 (BLIN et al., 2019), e os BGCs selecionados foram curados manualmente utilizando-se o banco de dados *protein refseq* do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e o algoritmo de alinhamento blastp (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL et al., 1990) para comparação por homologia, auxiliados pelo software Geneious Prime (KEARSE et al., 2012).

Análises comparativas utilizando-se vários genomas foram realizadas utilizando-se os softwares Mauve *alignment* (DARLING et al., 2004) e MultiGeneBlast (MEDEMA; TAKANO; BREITLING, 2013). Relações evolutivas foram determinadas utilizando-se o software para alinhamento de sequências de aminoácidos MUSCLE 3.8.425 (EDGAR, 2004), e visualizadas através da construção de árvores filogenéticas pelo Geneious Tree Builder (KEARSE et al., 2012), ambos empregando-se as configurações padrões disponíveis de cada software.

Outros bancos de dados foram consultados quando necessário, como SciFinder (ACS-SOLUTION, 2020), Norine (CABOCHE et al., 2008), MIBiG (KAUTSAR et al., 2019) e PDB (BERMAN et al., 2000).

4.1.7 Primers e Enzimas

Todos os primers utilizados neste trabalho foram sintetizados pela Sigma-Aldrich (Tabela S1).

Enzimas de restrição (BamHI, Eco-RV, NcoI, SmaI, SacI, XbaI) são da marca New England BioLabs, enquanto T4 DNA ligase, e DNA polimerases, Phusion e DreamTaq Green, são da ThermoScientific.

4.1.8 Reação em cadeia da polimerase e análises controle por eletroforese em gel

Reações em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reactions*, PCR) foram realizadas em um termociclador T100 (Bio-Rad), de acordo com instruções dos fabricantes de cada DNA polimerase utilizada. Para reações utilizando-se Phusion, cada reação de 50 μ L consistiu em 100 ng de DNA *template*, 1 μ L de dNTP mix 10 mM (ThermoScientific), 0,5 μ L de cada primer a 10 μ M, 1,5 μ L de DMSO e 10 μ L de 5X HF Phusion buffer. O termociclador foi programado para 1 min de desnaturação inicial à 98 °C; seguido de 30 ciclos de: 10 s de desnaturação à 98 °C, 30 s de anelamento, e 30 s/kb de extensão à 72 °C; e uma extensão final de 10 min à 72 °C. Para reações utilizando-se DreamTaq, cada reação de 25 μ L consistiu em 2 μ L de DNA *template*, 0,5 μ L de dNTP mix 10 mM (ThermoScientific), 0,25 μ L de cada primer a 10 μ M, 1,5 μ L de DMSO e 2,5 μ L de 10X Green Taq buffer. O termociclador foi programado para 3 min de desnaturação inicial à 94 °C; seguido de 30 ciclos de: 30 s de desnaturação à 94 °C, 30 s de anelamento, e 1 min/kb de extensão à 72 °C; e uma extensão final de 10 min à 72 °C. A temperatura de anelamento foi calculada utilizando-se Tm Calculator (NEB-INC., 2020).

A menos que especificado, análises controle por eletroforese foram realizadas em gel contendo 1% agarose (Agarose I™, VWR Life Science) em tampão tris-acetato-EDTA (50X TAE buffer, Bio-Rad). Utilizou-se uma alíquota de 5-10 μ L das amostras + 1-2 μ L de 6X *loading dye* (ThermoScientific). Em todas as análises, 3 μ L DNA *gene ruler* de 1-10 kb (ThermoScientific) também foi aplicado. Cada corrida foi efetuada à 110 V, 400 mA, por 60 min. Os géis foram corados utilizando corante Gel Red™ Nucleic Acid gel 10.000X em água (GoldBio) por pelo menos 20 min, e revelado sob luz ultravioleta.

O produto da PCR foi recuperado utilizando-se DNA Clean & Cocentrator-5™ ou Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit, ambos da Zymo Research.

4.2 *Pseudovibrio brasiliensis* Ab134

4.2.1 Linhagens bacterianas

Pseudovibrio brasiliensis Ab134 (aka *P. denitrificans*) foi isolada a partir da esponja marinha *Arenosclera brasiliensis* (FRÓES et al., 2018; RUA et al., 2014), coletada em Búzios, RJ – Brasil. *P. brasiliensis* Ab134 sempre foi cultivada no meio de cultura caldo marinho (*Marine Broth* 2216, Difco – MB) ou caldo marinho agar (*Marine Agar* 2216, Difco – MA).

Escherichia coli DH5 α (λ pir) e *E. coli* SM10(λ pir) foram fornecidas pelo Prof. Dominique Schneider (Universidade de Grenoble, França) e foram cultivadas em meio de cultura líquido Luria-Bertani (Sigma-Aldrich – LB) ou meio de cultura sólido, LB ágar (Sigma-Aldrich – LBA).

4.2.2 Reativação da produção de dibromotirosinas por *P. brasiliensis* Ab134

O primeiro estudo do metabolismo secundário da linhagem bacteriana *P. brasiliensis* Ab134 (NICACIO et al., 2017) levou ao isolamento de três compostos da classe das dibromotirosinas, o ácido verongidóico, a 11-hidroxiaerotionina e a fistularina-3, assim como a detecção de outros quatro compostos pertencentes a essa classe, a aerotionina, o éster do ácido purpurocerático B, a purealidina L e a aplisinamisina-II (Figura 4.2).

Derivados das dibromotirosinas foram os primeiros PNs isolados a partir de esponjas marinhas, sendo majoritariamente obtidos de membros da ordem Verongiida (*Aplysina* spp., *Ianthella* spp., *Pseudoceratina* spp., *Subera* spp., *Verongula* spp., *Psammoplysilla* spp., *Druinella* spp., *Verongia aerophoba*, *Aiolochoia crassa* e *Hexadella* sp.) (IÓCA; NICACIO; BERLINCK, 2018). Porém, também já foram isolados a partir de esponjas marinhas pertencentes às ordens Dicyoceratida (*Ircinia* spp.) e Haplosclerida (*Oceanapia* sp.), assim como de equinodermos (*Himerometra magnipinna*). A produção de derivados da dibromotirosina por *P. brasiliensis* Ab134 é o primeiro relato da produção dessa classe de PNs por um microrganismo (NICACIO et al., 2017).

Figura 4.2 – Dibromotirosinas isoladas ou detectadas em extrato do meio de cultivo de *P. brasiliensis* Ab134.

Fonte: Autoria própria.

O fato das dibromotirosinas serem produzidas em meio de cultura por uma bactéria possibilita estudos de biossínteses a nível molecular, empregando-se metodologias de genética reversa e subsequente avaliação do perfil metabólico de mutantes para identificação do seu BGC e, também possíveis intermediários de biossíntese. A estrutura única destes alcaloides motivaram a continuidade do estudo do metabolismo de *P. brasiliensis* Ab134, e sequenciamento do seu genoma.

Uma série de experimentos foram feitos com o intuito de reproduzir a produção das dibromotirosinas em *P. brasiliensis* Ab134. Foi realizado um planejamento experimental completo (PEREIRA-FO, 2015), variando-se a concentração de sais, nutrientes, temperatura e tempo de crescimento, e um planejamento fatorial fracionado (CASTRO et al., 2016), variando-se todos os componentes do meio de cultivo (amido, glicose, peptona, extrato de levedura, extrato de carne e triptona).

Também se cultivou esta linhagem alterando-se individualmente a temperatura, a velocidade de agitação, a forma do inóculo (utilizando *plugs* da bactéria cultivada em placa de MA ou um pré-inóculo líquido), o uso de resinas novas e recuperadas e a marca do meio de cultura (HiMedia® e Difco™). Além desses experimentos, realizou-se o cultivo de *P. brasiliensis* Ab134 em meio de cultura sólido MA, procedendo com a extração do *pellet* com MeOH. Como não se obteve sucesso em nenhuma das abordagens acima citadas, os dados correspondentes a esses experimentos não serão aqui apresentados.

A constatação de que a produção dessa classe de compostos não ter sido reproduzida quando se cultivou *P. denitrificans* Ab134 sob as mais diferentes condições não é um caso isolado na literatura. O alcalóide manzamina A, inicialmente detectado por MALDI-MS no meio de cultivo da linhagem bacteriana *Micromonospora* sp. M42, associada à esponja marinha *Acanthostrongylophora ingens*, teve sua produção interrompida, sendo que pequenas quantidades foram detectadas entre os dias 3-5 de crescimento em placa. Inúmeras tentativas foram descritas para aumentar a produção desse composto, mas todas sem sucesso (WATERS et al., 2014). O nucleosídeo nucleocidina também teve sua produção interrompida pela linhagem *Streptomyces calvus* ATCC13382 por mais de 60 anos. Após um estudo minucioso do genoma de *S. calvus*, notou-se um gene *bldA* deficiente, codificante para Leu-tRNA^{UUA}, necessário para a esporulação e expressão do metabolismo secundário. A adição deste gene funcional à *S. calvus* enfim restaurou a produção da nucleocidina (ZHU et al., 2015).

4.2.3 Mapa genético de *P. brasiliensis* Ab134

O genoma de *P. brasiliensis* Ab134 foi sequenciado por tecnologia Illumina e Oxford Nanopore, obtendo-se um genoma de 6.030.510 bp, com 52,1% de conteúdo GC, em 7 *contigs*. Reações de PCR foram realizadas (pares de primers utilizados são apresentados na Tabela S2) para se fechar os *gaps* restantes e confirmar a presença de plasmídeos.

4.2.4 Procedimento de genética reversa em *P. brasiliensis* Ab134

A metodologia de genética reversa consiste na deleção do gene alvo via recombinação homóloga. Para a linhagem bacteriana *P. brasiliensis* Ab134 utilizou-se o vetor pDS132, já reportado para este fim em bactérias pertencentes a família Rhodobacteraceae (DZIEWIT et al., 2015; PHILIPPE et al., 2004).

Após a construção do plasmídeo de deleção, este foi introduzido em *P. brasiliensis* Ab134 por conjugação com *E. coli* SM10(λ pir). Duas abordagens foram feitas: i) substituição do gene alvo por um gene de resistência à antibiótico, e ii) deleção *in frame* do gene alvo.

Os primers utilizados para a clonagem dos amplicons e confirmação dos mutantes são listados na Tabela S3.

Substituição do gene alvo por um gene de resistência a antibiótico

A primeira abordagem utilizada para o desenvolvimento dos mutantes *pppA* e *pppD*, consistiu na construção de uma cassete de deleção contendo o gene que confere resistência a kanamicina (*neo*), flanqueado por amplicons de aproximadamente 700 bp *up* e *downstream* ao gene alvo. Deste modo o gene alvo é substituído por *neo* via recombinação homóloga (Figura 4.3).

O DNA genômico (gDNA) de *P. brasiliensis* Ab134 foi obtido a partir de uma cultura de 5 mL em MB, à 30 °C, por uma noite, e extraído utilizando-se GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich). gDNA foi utilizado como *template* para amplificar os fragmentos de DNA *up* e *downstream* ao gene alvo, utilizando Phusion DNA polimerase. O vetor pUCPneo foi utilizado como *template* para amplificar *neo*. Os amplicons foram montados fazendo-se uso de sequências complementares adicionadas as extremidades dos amplicons, denominadas *overhangs*, utilizando-se PCR (*Splicing by Overhang Extention Polymerase Chain Reaction*, SOE-PCR). Os primers foram desenhados de maneira a conter os *overhangs* necessários (destacados em azul, Tabela S1), assim como os sítios de restrição XbaI (destacados em vermelho, Tabela S1) para clonagem no vetor pDS132 (DZIEWIT et al., 2015).

Figura 4.3 – Desenho experimental para deleção de gene alvo em *P. brasiliensis* Ab134 via substituição por gene de resistência a kanamicina (*neo*).

Fonte: Autoria própria. WT: *wild-type*, cepa selvagem; *Cm*: gene de resistência a cloranfenicol, *sacB*: gene da levansucrase para contra-seleção; ^s: linhagem sensível ao antibiótico; ^R: linhagem resistente ao antibiótico.

O amplicon contendo fragmento *upstream* + *neo* + fragmento *downstream* e o vetor pDS132 foram digeridos com XbaI (37 °C por 2h) e posteriormente inativada incubando-a à 80 °C por 20 min. Para a reação de ligação entre amplicon + vetor utilizou-se a enzima T4 DNA ligase, na proporção de 2:3 vetor/amplicon, incubada a temperatura ambiente por 2h. À 50 µL de células de *E. coli* DH5α(λpir) foi adicionado 8 µL da reação de ligação e ambos foram incubados em gelo por 30 min, seguidos de uma incubação à 42°C por 55 s, retornando ao gelo por mais 2 min. Adicionou-se 900 µL de caldo SOC (2% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 10 nM de NaCl, 2,5 nM de KCl, 10 nM de MgCl₂ e 20 nM de glicose), e as células foram incubadas à 37°C, 200 rpm por 2h. A transformação foi inoculada em placas seletivas contendo LB-kanamicina (50 µg/mL) e incubadas à 37 °C por uma noite. Clones resistentes à kanamicina foram incubados em 5 mL de LB-kanamicina (50 µg/mL) à 37 °C, 200 rpm, por uma noite. O plasmídeo foi extraído de cada cultura utilizando-se ZR Plasmídeo Miniprep™ Classic Kit (Zymo Research). Todos os passos foram monitorados por eletroforese em gel de agarose (sessão 4.1.8). Ao plasmídeo construído para deleção do gene *pppA* foi dado o nome pJD01, e ao plasmídeo para deleção de *pppD*, pLI01. Os plasmídeos foram transformados para a linhagem conjugativa *E. coli* SM10(λpir) seguindo o mesmo protocolo realizado para a *E. coli* DH5α(λpir).

O plasmídeo de deleção foi introduzido em *P. brasiliensis* Ab134 por conjugação com *E. coli* SM10(λ pir). Para isso, *P. brasiliensis* Ab134 foi cultivada em 20 mL de MB e *E. coli* SM10(λ pir)/pJD01 ou pLI01 em 20 mL de LB + kanamicina (50 μ g/mL) até OD₆₀₀ 0,600, à 30 °C e 200 rpm. As células foram recuperadas por centrifugação à 4000 rpm e 4 °C, e ressuspensas em 2 mL dos respectivos meios de cultivo. Misturou-se uma alíquota de 0,50 mL de cada cultura, a qual foi inoculada em placa contendo MA, incubando-a à 30 °C por 16-20 h. Um loop ($\approx$ 10 μ L) foi estriado em placas de MA + kanamicina (200 μ g/mL) + carbenicilina (25 μ g/mL), para selecionar clones que receberam o plasmídeo e matar seletivamente a linhagem de *E. coli*, respectivamente. Os clones resistentes a kanamicina foram estriados utilizando-se a técnica de réplica de placas: o mesmo clone foi estriado em placas de MA + kanamicina (200 μ g/mL) e MA + cloranfenicol (2 μ g/mL), para verificar a presença de mutantes *single crossover* (SCO, Kan^R + Cm^R) ou *double crossover* (DCO, Kan^R + Cm^S). Em caso de não se obter DCO na primeira tentativa de réplica de placas, SCO confirmados por PCR (par de primers utilizado descrito na Tabela S3) foram estriados em placas de MA, e incubados à 30°C por 2 dias. Após esse período, um loop de células foi estriado em placas de MA + 5 % de sacarose (o plasmídeo contém o gene *sacB* para contra-seleção) e incubados à 30 °C por 2 dias. Os clones obtidos foram estriados, até obter-se colônias únicas, as quais foram testadas por réplica de placas para DCO. DCO foram confirmados por PCR (par de primers utilizado descrito na Tabela S3). gDNA dos DCO confirmados por PCR foi extraído utilizando-se GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich), a partir de culturas de 5 mL de MB + kanamicina (200 μ g/mL) à 30 °C, 200 rpm, por uma noite, e a PCR repetida.

Deleção in frame do gene alvo

A segunda abordagem foi utilizada para o desenvolvimento dos mutantes *pppH*, *pppI* e *pppJ*, e consistiu na construção de uma cassette para deleção *in frame*, gerando uma versão inativa da proteína codificada pelo gene alvo, sem atrapalhar a leitura dos demais ORF (Figura 4.4).

De modo geral, o procedimento utilizado foi o mesmo descrito anteriormente, com pequenas modificações: 1) a transformação das linhagem *E. coli* DH5 α (λ pir) e *E. coli* SM10(λ pir) foi inoculada em placas seletivas contendo LB-cloranfenicol (25

µg/mL), e 2) após a confirmação de SCO, utilizou-se placas de contra-seleção contendo MA + 5 % de sacarose para obter DCO.

Figura 4.4 – Desenho experimental para deleção *in frame* de gene alvo em *P. brasiliensis* Ab134.

Fonte: Autoria própria.

4.2.5 Bioensaios de motilidade flagelar

Os bioensaios de motilidade flagelar foram planejados de acordo com protocolos reportados anteriormente (FILLOUX; RAMOS, 2014). Para o bioensaio de *swarming*, utilizou-se placas contendo 20 mL de MB + 0,5% de ágar, enquanto para bioensaios de *swimming* utilizou-se MB + 0,3 %. Antes do preparo das placas, o meio de cultura foi previamente equilibrado em banho de água de 50 °C por 2 h. Após verter o meio de cultura, a placa foi deixada secar dentro do fluxo laminar por 15 min antes do inóculo. Para ensaios de *swarming*, aplicou-se gentilmente ao centro da placa 4 µL de um pré-inóculo, crio-preservado de uma cultura com OD₆₀₀ 1,0 em 20 % glicerol. Para ensaios de *swimming*, 1 µL do mesmo pré-inóculo foi inoculado dentro da camada de ágar, evitando tocar o fundo da placa. Depois do líquido ser absorvido no ágar (≈ 10-15 min), as placas foram incubadas à 30°C por até 4 dias. Duas marcas de ágar foram testadas, Bacto e Eiken. Todas as linhagens foram testadas em duplicatas e fotos foram documentadas a cada dia.

4.2.6 Ensaio de produção de surfactante

Ensaio de colapso de gota foram feitos de acordo com metodologia descrita anteriormente (DOSE et al., 2018), com pequenas modificações. Uma gota de água de 20 μ L foi colocada em uma superfície hidrofóbica (Parafilm®), seguida pela adição de 5 μ L de suspensão de células bacterianas a partir de uma cultura noturna de 5 mL MB. A absorbância da suspensão de células foi ajustada para OD₆₀₀ 0,25. Utilizou-se água como controle negativo e uma solução de 0,1% de Tween 20 como controle positivo. O ensaio foi realizado em triplicata.

Um segundo ensaio foi realizado da mesma maneira utilizando-se uma alíquota de 1 mg do extrato de cada linhagem bacteriana, ao invés da cultura de células.

4.2.7 Bioensaio de formação de biofilme

O bioensaio de formação de biofilme foi planejado de acordo com protocolos reportado anteriormente (PAUWELYN et al., 2013). Utilizou-se placas de 48-poços (Falcon). A cada poço adicionou-se 990 μ L de MB e 10 μ L de uma cultura OD₆₀₀ $\approx$ 1. Depois do período de crescimento (24 h ou 48 h), a mistura de meio de cultura e células em suspensão foi removida cuidadosamente, e cada poço foi limpo com 1 mL de água do mar artificial (Instant Ocean). As células aderidas às paredes e ao fundo de cada poço foram coradas com uma solução de 0,1% cristal-violeta (Sigma-Aldrich®) incubada por 10 min (1 mL/poço). O corante foi removido e a placa foi limpa com água deionizada corrente. Após um período de 30 min, as células foram descoloridas utilizando uma solução de 95 % EtOH. A absorbância em 595 nm (OD₅₉₅) de cada poço foi medida. Água do mar artificial foi utilizada como inóculo do controle negativo. Cada linhagem foi testada em seis poços.

4.2.8 Avaliação de metodologias de cultivo e extração para isolamento de compostos produzidos por *P. brasiliensis* Ab134

A linhagem *P. brasiliensis* Ab134 foi cultivada em meio líquido (com/sem resinas XAD-2, -4 e -7HP, com/sem algodão) e em meio semissólido, com o intuito de se avaliar a melhor metodologia para o isolamento dos compostos produzidos pelo

NRPS-PKS BGC dessa bactéria. Todos os experimentos foram realizados utilizando-se o meio de cultura caldo marinho, e incubados à temperatura constante de 30 °C.

Cultura líquida com resinas

Inicialmente foi realizado um cultivo em pequena escala de *P. brasiliensis* Ab134 em 1 L de meio de cultura MB (Difco™). Para isso foram preparados dois frascos Erlenmeyer de 1 L contendo 500 mL de meio de cultura MB (Difco™) e 50 g (10 % *m/v*) de uma mistura de resinas XAD-2, -4 e -7HP, esterilizados em autoclave. Para inóculo foi utilizado um pré-inóculo cultivado a partir de uma 1 mL de cultura preservada em glicerol 20 % e armazenada em freezer -80 °C, que foi inoculada em 10 mL de MB (sem resinas) e cultivada por 24 h, sob agitação de 160 rpm, à 30 °C. Cada frasco Erlenmeyer do experimento de cultivo foi inoculado com 5 mL do pré-inóculo (1 % *v/v*).

Este experimento foi deixado sob agitação de 160 rpm, à 30 °C por 5 dias. Após o tempo de crescimento, a mistura meio de cultivo + resinas XAD foi filtrada. A mistura de resinas XAD foi extraída com MeOH, MeOH/acetona 1:1 e acetona. Os solventes foram reunidos e evaporados. O extrato orgânico seco foi ressuspenso em MeOH/H₂O 9:1 e particionado em hexano. O extrato hexânico foi descartado, e o extrato metanólico foi filtrado em uma membrana de 0,2 µm (Minisart RC25). O filtrado contendo meio de cultivo e crescimento bacteriano foi esterilizado em autoclave para descarte.

O extrato obtido foi fracionado em coluna empacotada com sílica-gel derivatizada com grupo octodecil (C18), utilizando-se um gradiente de MeOH em H₂O (40 mL para cada mistura da fase móvel), obtendo-se 6 frações. As frações foram analisadas por MALDI-TOF DD, HPLC-UV-MS e UPLC-MS. Apesar dos compostos de interesse terem sido observados em algumas frações após análises por MALDI-TOF, não foi possível constatar a presença dos mesmos nas análises por HPLC-UV-MS e UPLC-MS. Desse modo, optou-se por realizar um crescimento em larga escala, seguindo o mesmo procedimento, com pequenas modificações.

Assim, *P. brasiliensis* Ab134 foi cultivada em 27 L de meio de cultura MB (Difco™). Para isso foram preparados 270 frascos Schott® de 500 mL contendo 100 mL de meio de cultura MB (Difco™) e 10 g (10% *m/v*) de uma mistura de resinas XAD-2, -4 e -7HP, todos esterilizados por autoclave. Para inóculo foi utilizado um pré-

inóculo cultivado a partir de 1 mL de cultura preservada em glicerol 20 % e armazenada em freezer -80 °C, que foi inoculada em 100 mL de MB (sem resinas) e cultivada por 36 h, sob agitação de 160 rpm, à 30 °C. Cada frasco Schott® do experimento de cultivo foi inoculado com 1 mL do pré-inóculo (1 %). As demais etapas de incubação e extração foram feitas exatamente como descrito acima.

O extrato obtido foi fracionado em várias etapas, que incluiu fracionamento em coluna empacotada com sílica-gel derivatizada com grupo C18, fracionadas em coluna de permeação em gel Sephadex LH20 e HPLC utilizando-se colunas semi-preparativa de fase reversa. Todas as etapas foram monitoradas por análises HPLC-UV-MS e/ou UPLC-MS, no entanto, os compostos de interesse não foram observados.

Cultura líquida com algodão

Alguns relatos na literatura mostraram que a presença de uma superfície para a adesão das células (algodão) durante o cultivo de linhagens marinhas de *Pseudoalteromonas* spp. em meio líquido induziu a produção de PNs (TIMMERMANS et al., 2019). Deste modo, o mesmo procedimento foi utilizado para avaliar a produção de PNs por *P. brasiliensis* Ab134 na presença e ausência de algodão (Figura 4.5).

Para isso, *P. brasiliensis* Ab134 foi cultivada em 50 mL de meio de cultura MB (Difco™) em frascos Erlenmeyer de 250 mL sem ou com 2 bolas de algodão, todos esterilizados por autoclave. Para inóculo foi utilizado um pré-inóculo cultivado a partir de 1 mL de cultura preservada em glicerol 20 % e armazenada em freezer -80 °C, que foi inoculada em 5 mL de MB (sem resinas) e cultivada por 24 h, sob agitação de 160 rpm, à 30 °C. Cada frasco Erlenmeyer do experimento de cultivo foi inoculado com 1 mL do pré-inóculo (1 % v/v) e foi deixado sob agitação de 160 rpm, à 30 °C por 5 dias.

Após o período de crescimento, o algodão foi recuperado e extraído com MeOH por sonicação a 40 kHz durante 5 min, gerando o extrato 1. A mistura células + meio de cultivo foi centrifugada à 4000 rpm por 10 min à temperatura ambiente. As células foram extraídas com MeOH por sonicação a 40 kHz durante 5 min, gerando o extrato 2. Ao sobrenadante foram adicionados 50 mL de AcOEt, que após partição líquido-líquido, gerou o extrato 3. À fração aquosa adicionou-se 5 g de (10% m/v) de uma mistura de resinas XAD-2, -4 e -7HP. A mistura fração aquosa + resinas foi deixada sob agitação por 48 h, e após esse período foi recuperada e extraída como descrito acima. Todos os extratos foram analisados por MALDI-TOF DD.

Figura 4.5 – Foto das culturas de *P. brasiliensis* Ab134 com e sem algodão (A) e destaque para a quantidade de células presente no meio líquido após centrifugação (B) nas mesmas culturas.

Fonte: Autoria própria.

Cultura semissólida

P. brasiliensis Ab134 foi cultivada em 10 placas contendo 20 mL de MB + 0,5 % de ágar Eiken (total de 200 mL) durante 5 dias à 30 °C. Antes do preparo das placas, o meio de cultura foi previamente equilibrado em banho de água de 50 °C por 2 h. Após verter o meio de cultura, a placa foi deixada secar dentro do fluxo laminar por 15 min antes do inóculo. Cada placa foi inoculada no centro com 4 µL de um pré-inóculo inóculo cultivado a partir de 50 µL de uma cultura preservada em glicerol 20 % e armazenada em freezer -80 °C, que foi inoculada em 5 mL de MB (sem resinas) e cultivada por 24 h, sob agitação de 160 rpm, à 30 °C. Depois do líquido ser absorvido no ágar (≈ 10-15 min), as placas foram vedadas utilizando-se Parafilm®, e posicionadas no incubador com a face virada para cima, sem empilhar.

Após o período de crescimento, as células e meio de cultura foram transferidos para um béquer utilizando-se uma espátula, congelados e liofilizados. O sólido liofilizado foi extraído com MeOH (2X) por sonicação a 40 kHz durante 30 min. A mistura de células + meio + solvente foi filtrada e o solvente de extração foi evaporado, fornecendo o extrato, que foi analisado por MALDI-TOF DD.

4.2.9 Isolamento e determinação estrutural das pseudovibriamidas produzidas por *P. brasiliensis* Ab134 em meio semissólido

A bactéria marinha *P. brasiliensis* Ab134 foi cultivada em 2.000 placas contendo 20 mL de MB + 0,5 % de ágar Eiken (total de 40 L) durante 3 dias à 30 °C. O preparo das placas foi realizado como descrito acima. Cada placa foi inoculada no centro com 4 µL de um pré-inóculo (crio-preservação de uma cultura com OD₆₀₀ 1,0 em 20 % glicerol). Depois do líquido ser absorvido no ágar (≈ 10-15 min), as placas foram vedadas utilizando-se Parafilm®, e posicionadas no incubador com a face virada para cima, sem empilhar, para evitar a condensação de água na tampa.

Três extratos foram gerados a partir das placas de cultivo: F, FD e C.

Fracionamento do extrato F

O extrato F (“F” abreviação para extrato do filtrado) foi obtido a partir de 400 placas de *swarm*, das quais as células e o meio de cultura foram transferidos para um béquer utilizando-se uma espátula, e posteriormente congelados. Depois do degelo, a mistura obtida foi centrifugada à 4.000 rpm e 17 °C por 30 min. O líquido foi separado por filtração e 10% *m/v* de uma mistura de resinas XAD-2, -4, -7HP e -16 (1:1:1:1) foi adicionada, mantendo-se sob agitação por uma noite. A mistura de resinas foi recuperada por filtração, lavadas com água (2X), e os compostos foram dessorvidos utilizando-se com MeOH (2X) e acetona (1X). Os solventes orgânicos de extração das resinas foram reunidos e evaporados, fornecendo o extrato bruto F (4,9 g).

O fracionamento do extrato F está sumarizado na Figura 4.6. Todas as etapas foram monitoradas por análises MALDI-TOF DD.

O extrato F foi solubilizado em MeOH e centrifugado à 4000 rpm por 10 min. O pellet foi descartado e o sobrenadante foi adsorvido na resina Diaion® HP-20SS (Supelco® Sigma-Aldrich). Após a evaporação do solvente, a mistura extrato + resina foi empacotada acima de coluna pré-empacotada da mesma fase (10 g) e fracionada utilizando-se um gradiente de isopropanol (i-PrOH) em H₂O (100 mL para cada mistura da fase móvel), obtendo-se 4 frações (1).

A fração F2 (556,8 mg) foi fracionada em coluna pré-empacotada contendo sílica derivatizada com grupo octodecil (C18, Supelco® Sigma-Aldrich, 5 g), utilizando-

se um gradiente de MeOH em H₂O (40 mL para cada mistura da fase móvel), obtendo-se 3 frações (2).

Figura 4.6 – Fluxograma de fracionamento do extrato F, obtido a partir do cultivo de *P. brasiliensis* Ab134 em 400 placas contendo meio semissólido.

Fonte: Autoria própria. Etapas de fracionamento: 1 Fracionamento em coluna (HP20). 2 Fracionamento em coluna (C18). 3 Fracionamento em HPLC preparativo (C18). 4 Fracionamento em HPLC preparativo (C8). 5 Fracionamento em HPLC (HILIC).

A fração F2B (415,7 mg) foi fracionada em HPLC usando coluna semi-preparativa Onyx-Monolithic C18 (100 x 4,6 mm, Phenomenex), em modo gradiente de 10 à 30% MeOH/MeCH 1:1 em H₂O + 0,1% HCO₂H em 12 min, com fluxo de 4 mL/min. Frações de 30 s foram coletadas por um coletor automático, totalizando 24 frações, posteriormente reunidas em 5 frações (3).

A fração F2B67 (48,8 mg) foi fracionada em HPLC-UV, utilizando-se uma coluna Kinetex C18 (250 x 10 mm, 100 Å, Phenomenex), em modo isocrático 19%

MeOH/MeCN 1:1 em H₂O + 0,1% HCO₂H, com fluxo de 4 mL/min por 30 min, obtendo-se 4 frações (4).

A fração F2B67D (14,2 mg) foi fracionada por HPLC-UV em coluna analítica HILIC Luna (150 x 4,6 mm, 5 µm, Phenomenex), em modo isocrático 9:1 MeCN/H₂O (ambos acidificados com 0,1% HCO₂H), com fluxo de 1 mL/min por 15 min (5), obtendo-se o composto 5,5 mg do composto 1 (F2B67D3) e 2,7 mg do composto 2 (F2B67D1).

As frações F2B67D1 e F2B67D3 foram analisadas por UPLC-QTOF-MS e MS² e RMN.

As frações F2B8 (17,7 mg) e F2B910 (31,7 mg) também foram submetidas à fracionamentos por HPLC-UV, no entanto nenhum dos compostos de interesse foram obtidos em quantidades ou pureza suficientes para análises de RMN.

Fracionamento do extrato FD

O extrato FD ("FD" abreviação para extrato do liofilizado, termo em inglês, *freeze-dried*) foi obtido a partir de 600 placas de *swarm*, das quais células e meio de cultura foram transferidos para um béquer utilizando-se uma espátula, congelados e liofilizados. O sólido liofilizado foi extraído com MeOH (2X) por sonicação a 40 kHz durante 30 min. A mistura de células + meio + solvente foi filtrada e o solvente de extração foi evaporado, fornecendo o extrato FD (50,5 g).

O fracionamento do extrato FD está sumarizado na Figura 4.7. Todas as etapas também foram monitoradas por análises HPLC-UV-MS e/ou UPLC-MS.

O extrato FD foi solubilizado em MeOH e centrifugado à 1000 rpm por 30 min. O pellet foi descartado e o sobrenadante teve o solvente evaporado sob vácuo (1). Os 35 g obtidos foram fracionados em coluna pré-empacotada contendo sílica derivatizada com grupo octodecil (C18, Stracta C₁₈-E, 55 µm, 70Å, Phenomenex, 10 g), utilizando-se um gradiente de MeOH em H₂O, ambos acidificados com 0,1% HCO₂H (100 mL para cada mistura da fase móvel), obtendo-se 3 frações (2).

A fração FD2 (2,9 g) foi fracionada em coluna pré-empacotada contendo sílica derivatizada com grupo fenila (Stracta Phenyl, 55 µm, 70Å, Phenomenex, 5 g), utilizando-se um gradiente de MeOH em H₂O, ambos acidificados com 0,1% HCO₂H (60 mL para cada mistura da fase móvel). Obteve-se 6 frações, que foram posteriormente reunidas em 3 frações (3).

A fração FD2B (690,0 mg) foi submetida à cromatografia de permeação em gel Biogel-P2 (40-90 μm , Bio-Rad; dimensões: 103 x 2 cm) eluída com 4:1 $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$, ambos com 0,5% HCO_2H . Duzentas frações (4 mL/20min) foram coletadas, e posteriormente reunidas em 5 frações (4).

Figura 4.7 – Fluxograma de fracionamento do extrato FD, obtido a partir do cultivo de *P. brasiliensis* Ab134 em 600 placas contendo meio semissólido liofilizadas.

Fonte: Autoria própria. Etapas de fracionamento: ① Solubilização do extrato em MeOH e descarte do precipitado. ② Fracionamento em coluna (C18). ③ Fracionamento em coluna (fenila). ④ Fracionamento em coluna de permeação em gel Biogel-P2. ⑤ Fracionamento em HPLC (C18-PFP). ⑥ e ⑦ Fracionamento em HPLC (fenila).

A fração FD2B3 (177,3 mg) foi fracionada por HPLC-UV, utilizando-se coluna Kinetex PFP (250 x 4,6 mm, 5 μm , 100 Å, Phenomenex), em modo isocrático 25% MeOH/MeCN 11:14 em H_2O , todos acidificados com 0,1% HCO_2H , com fluxo de 1 mL/min por 40 min, obtendo-se 5 frações (5).

A fração FD2B3D (6,5 mg) foi novamente fracionada por HPLC-UV, utilizando-se uma coluna Inertisil Ph-3 (250 x 4,6 mm, 5 μm , 100 Å, GL Sciences), em modo

isocrático 25% MeOH/MeCN 3:2 em H₂O, todos acidificados com 0,1% TFA, com fluxo de 1 mL/min (⑥), obtendo-se os 2,0 mg do composto **2** (FD2B3D1). A fração FD2B3A (4,4 mg) foi fracionada por HPLC-UV utilizando a mesmo método para obter 2,0 mg do composto **3** (FD2B3A1), enquanto a partir da fração FD2B3C (2,8 mg) obteve-se 0,2 mg do composto **4** (FD2B3C1). A fração FD2B2 (66,2 mg) foi parcialmente fracionada em HPLC-UV, utilizando-se a mesma coluna, em modo isocrático 26% MeOH/MeCN 15:11 em H₂O, todos acidificados com 0,1% TFA, com fluxo de 1 mL/min (⑦), obtendo-se 0,5 mg de uma mistura de isômeros, identificadas como compostos **5-6**.

Todas as frações contendo apenas um pico cromatográfico, foram analisadas por UPLC-QTOF-MS e MS² e RMN.

Fracionamento do extrato C

O extrato C (“C”, abreviação para extrato de células) foi obtido a partir de 1000 placas de *swarm*, das quais as células foram separadas do meio de cultura utilizando-se raspagem com uma espátula (Figura 4.8). As células foram extraídas com MeOH (2X) por sonicação à 40 kHz por 30 min, gerando um extrato de 28,7 g.

Figura 4.8 – A) Imagem de uma placa de *swarm* antes e durante a recuperação das células (espátula com células à direita). B) Foto do volume de células obtido a partir de 500 placas de *swarm* após congelamento e degelo. C) Imagem do meio de cultivo liofilizado.

Fonte: Autoria própria.

O fracionamento do extrato C está sumarizado na Figura 4.9. Todas as etapas foram monitoradas por análises HPLC-UV-MS e/ou UPLC-MS.

O extrato C foi solubilizado em MeOH e centrifugado à 1000 rpm por 30 min (①). O pellet foi descartado (17,61 g) e o sobrenadante teve o solvente evaporado sob vácuo. Os 11,1 g obtidos foram fracionados em coluna pré-empacotada contendo sílica derivatizada com grupo octodecil (C18, Stracta C18-E, 55 µm, 70Å, Phenomenex,

10 g), utilizando-se um gradiente de MeOH em H₂O, ambos acidificados com 0,1% HCO₂H (100 mL para cada mistura da fase móvel), obtendo-se 4 frações (2).

Figura 4.9 – Fluxograma de fracionamento do extrato C, obtido a partir das células após o cultivo de *P. brasiliensis* Ab134 em 1000 placas contendo meio semissólido.

Fonte: Autoria própria. Etapas de fracionamento: 1 Solubilização do extrato em MeOH e descarte do precipitado. 2 Fracionamento em coluna (C18). 3 Fracionamento em coluna (fenila). 4 Fracionamento em coluna de permeação em gel Biogel-P2. 5 Fracionamento em HPLC (C18-PFP). 6 Fracionamento em HPLC (fenila).

As frações C2 (244,8 mg) e C3 (130,9 mg) foram reunidas e fracionadas em coluna pré-empacotada contendo sílica derivatizada com grupo fenila (Stracta Phenyl, 55 µm, 70Å, Phenomenex, 2 g), utilizando-se um gradiente de MeOH em H₂O, ambos acidificados com 0,1% HCO₂H (10 mL para cada mistura da fase móvel). Obteve-se 9 frações, que foram posteriormente reunidas em 5 frações (3).

A fração C23C (116,1 mg) foi submetida à cromatografia de permeação em gel Biogel-P2 (40-90 µm, Bio-Rad; dimensões: 103 x 2 cm) eluída com 4:1 H₂O/MeOH, ambos com 0,5% HCO₂H. Duzentas frações (4 mL/20 min) foram coletadas, e

posteriormente reunidas em 7 frações (4). A fração C23C4 (11,7 mg) apresentou apenas um pico cromatográfico, correspondendo ao composto 1.

A fração C23C1 (33,1 mg) foi fracionada por HPLC-UV, utilizando coluna Inertsil Ph-3 (250 x 4,6 mm, 5 µm, GL Sciences), em modo isocrático 29% MeOH/MeCN 17:12 em H₂O, todos acidificados com 0,1% TFA, com fluxo de 1 mL/min por 60 min (5), obtendo-se os 5,9 mg do composto 7 (C23C1B), 6,2 mg da mistura dos isômeros 8 e 9 (C23C1C), 2,7 mg do composto 10 (C23C1A) e 1,4 da mistura dos isômeros 11 e 12 (C23C1D).

Todas as frações contendo apenas um pico cromatográfico, C23C1A-D, foram analisadas por UPLC-QTOF-MS e MS² e RMN.

4.2.10 Determinação da configuração absoluta de aminoácidos das pseudovibriamidas

A configuração absoluta de aminoácidos presentes nas pseudovibriamidas foi determinada por análise de Marfey avançada. Optou-se por utilizar um processo de hidrólise suave (HUNT, 1985), na qual 100 µg de cada composto foram solubilizados em 1 mL de HCl 4 mol/L e aquecidos à 100 °C durante 6h, sob agitação constante. Ao término das reações de hidrólise, a solução foi resfriada à temperatura ambiente e evaporadas sob vácuo. O hidrolisado foi ressuspensionado em 1 mL de H₂O e seco 3X, para garantir a remoção de todo o ácido.

A derivatização de Marfey foi realizada utilizando-se uma solução de 1% de 5-fluor-2,4-dinitrofenil-Nα-L-triptofanamida (FDTA) em acetona (FREIRE et al., 2019; SALIB; MOLINSKI, 2017). O hidrolisado foi ressuspensionado em H₂O, seguido da adição de 20 µL de uma solução de NaHCO₃ 1M, e L-FDTA na concentração de 1,4X a concentração molar de aminoácido de cada composto hidrolisado. A mistura NaHCO₃ + L-FDTA + aminoácido foi mantida a 40 °C por 1h. Ao término da reação, as misturas foram resfriadas à temperatura ambiente e neutralizadas com 10 µL de HCl 2M.

Padrões de aminoácidos foram derivatizados tanto com L- quanto com D-DTA. Todas amostras derivatizadas foram analisadas por UPLC-QTOF-MS.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Mapa genômico de *P. brasiliensis* Ab134

Primers foram desenhados e reações de cadeia polimerase (PCR) foram realizadas para amplificar os *gaps* ainda restantes entre os 7 *contigs* do genoma de *P. brasiliensis* Ab134 obtidos após o sequenciamento por Illumina e Nanopore. Os *contigs* NODE 2, 3, 6 e 7 já apresentavam sequências complementares (setas duplas vermelhas, Figura 5.1A), indicando que estes *contigs* seriam replicons circulares. PCR amplificaram sequências complementares de DNA ainda maiores (setas duplas azuis, Figura 5.1A; resultados da PCR mostrados na Figura 5.1B) confirmando a presença de 4 plasmídeos, que foram nomeados, plasmídeos 1, 2, 4, e 5, respectivamente (Figura 5.2). Além disso, análises de homologia por blastp, confirmaram a presença do gene para a origem de replicação em cada um dos plasmídeos (Tabela 5.1).

O quinto plasmídeo (plasmídeo 3, Figura 5.2) foi proposto devido a presença de um gene para origem de replicação (replication protein RepCa2, *Rhizobium leguminosarum*, 99,7% coverage, 43,9% identity). Apesar de várias PCR terem sido feitas utilizando-se diferentes pares de primers para completar o *gap* existente na sequência de NODE 5, nenhuma amplificou essa região, e, portanto o plasmídeo 5 permaneceu com uma lacuna.

Os *contigs* NODE 1 e NODE 4 possuem uma região repetitiva (CTATCGAG) em uma das extremidades, a qual gera uma sobreposição de 104 bp entre eles. A natureza repetitiva dessa região impediu que esta fosse amplificada por PCR para determinar a sua extensão. Apesar disso, NODE 4 e 1 foram dados como contínuos. Ademais, tentativas de amplificar as outras extremidades de NODE 1 e 4 foram em vão. Assim, o genoma completo de *P. brasiliensis* Ab134 (Figura 5.2) é composto por um cromossomo (NODE 1 + 4), contendo 4,8 Mb, e um *gap*, dois (mega)plasmídeos 1 e 2, de 472 kb e 420 kb, respectivamente, e três plasmídeos menores, 2 (152 kb), 4 (107 kb) e 5 (40 kb).

Figura 5.1 – Resultados do desenho experimental para confirmar a presença de plasmídeos e completar *gaps* no genoma de *P. brasiliensis* Ab134. A) Representação das PCR, considerando o sítio de ligação do par de primers utilizado para confirmar os plasmídeos 1, 2, 4, e 5, a partir das sequências NODES 2, 3, 6, e 7. Setas duplas indicam sobreposições de sequências obtidas diretamente após o sequenciamento do genoma por Illumina e Nanopore (vermelho), ou amplificadas por PCR (azul). B) Foto do gel de agarose controle para avaliar o tamanho dos amplicons obtidos nas PCR.

Fonte: Autoria própria.

Figura 5.2 – Representação do genoma completo de *P. brasiliensis* Ab134. A origem de replicação de cada replicon e os BGC codificados por cada um são destacados. *Gaps* são indicados por setas pretas.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 5.1 – Montagem final do genoma completo de *P. brasiliensis* Ab134, destacando-se os resultados da comparação por homologia para a origem de replicação de cada replicon.

Contig	Replicon	Tamanho (bp)	GC (%)	Gap	Homologia (query: gene de replicação)	% Coverage/ % Identity
NODE 1+4	Cromossomo	4.836.820	52,2	1	<i>dnaA</i> (<i>Pseudovibrio</i> spp.)	99,3/100
NODE 2	Plasmídeo 1	472.905	52,6	0	replication protein C (<i>Pseudovibrio</i> sp. JE062)	97,5/97,2
NODE 3	Plasmídeo 2	420.747	52,6	0	replication protein C (<i>Pseudovibrio</i> sp. FO-BEG1)	99,7/99,5
NODE 5	Plasmídeo 3	152.038	49,0	1	replication protein RepCa2 (<i>Rhizobium leguminosarum</i>)	99,7/43,9
NODE 6	Plasmídeo 4	107.145	49,0	0	replication protein C (<i>P. axinellae</i>)	98,6/35,6
NODE 7	Plasmídeo 4	40.855	48,5	0	replication protein C (<i>Pseudovibrio</i> sp. Alg231)	99,7/69,2

Fonte: Autoria própria. Entende-se por % *coverage*, a porcentagem da sequência analisada (*query*) lida que pode ser comparada com a sequência depositada no banco de dados (homologia), considerando eventuais discordâncias ou gaps no alinhamento; *identity*: a porcentagem da sequência analisada (*query*) que é idêntica a sequência depositada no banco de dados (homologia).

5.2 Busca pelo BGC das dibromotirosinas no genoma de *P. brasiliensis* Ab134

Como mencionado na sessão 4.2.2, o primeiro estudo do metabolismo secundário da linhagem bacteriana *P. brasiliensis* Ab134 levou ao isolamento e identificação de compostos da classe das dibromotirosinas (NICACIO et al., 2017). No entanto, a produção desses PNs não foi reproduzida, ou re-ativada mesmo após extensos experimentos variando-se as condições de cultivo.

A rota de formação de compostos pertencentes à classe das dibromotirosinas intriga químicos de PNs há décadas. Acredita-se que estes compostos sejam derivados da L-Phe, que para dar origem à dibromotirosina, será hidroxilada por uma fenilalanina hidroxilase (1), levando a formação de L-Tyr, que por sua vez será bromada, presumidamente catalisada por peroxidases (B) (NIEMANN et al., 2015). A partir da dibromotirosina, supõe-se que o sistema bicíclico espiroisoxazolina seja formado pela oxidação do grupo amino de metil-dibromotirosina para uma cetoxima (3), e posterior oxidação do anel aromático envolvendo um óxido de areno altamente reativo (4), causando a abertura desse anel e a formação do ácido verongidóico (Figura 5.3A) (SILVA et al., 2010). Independentemente da ordem dos eventos durante a rota de biossíntese, o BGC deverá contar com uma brominase, uma enzima que capture resíduos de Phe ou Tyr, uma metil transferase (SAM), ao menos duas oxigenases (etapas 3 e 4), e uma ciclase (etapa 5, Figura 5.3A) (CARNEY; RINEHART, 1995; TYMIAK; RINEHART, 1981).

Para a formação da fistularina-3 e outros metabólitos mais complexos (Figura 5.3B), sugere-se uma rota de biogênese mais elaborada com a adição de outras unidades nitrogenadas (ROGERS; MOLINSKI, 2007), além de modificações pós-traducionais (destacadas em verde) (ROGERS et al., 2005). Sendo assim, o BGC das bromotirosinas ainda incluiria enzimas para captura de poliaminas (unidades em vermelho), uma tirosina descarboxilase (responsável por biossintetizar o resíduo em azul, Figura 5.3B) e ao menos uma amida sintase para unir todas as unidades.

Dado que o genoma de *P. brasiliensis* Ab134 possui apenas uma NRPS-PKS, a qual possui demasiados módulos para ser responsável pela biossíntese das dibromotirosinas, considerou-se a hipótese de que esses compostos sejam produzidos por uma NRPS tipo-II.

Figura 5.3 – Rota de biossíntese hipotética para o ácido verongidóico (A). Diferentes unidades biossintéticas de compostos mais complexos pertencentes a classes das dibromotirosinas (B).

A

B

Fonte: Autoria própria.

Considerando-se essa hipótese para a rota de biogênese das dibromotirosinas e utilizando-se do genoma completo de *P. brasiliensis* Ab134 como banco de dados, buscou-se genes homólogos a enzimas necessárias putativas: 1) brominases, 2) NRPS tipo-II codificantes para Phe ou Tyr, e 3) amida sintase.

Utilizando-se de brominases já caracterizadas disponíveis do banco de proteínas PDB como objeto de busca, dois genes presentes do cromossomo de *P. brasiliensis* Ab134 se destacaram (localizados em 1.031.707-1.020.886 e 1.268.796-3.286.083), apesar da baixa similaridade a nível de aminoácidos (< 29%). Análises manuais por blastp indicaram que ambos os genes são homólogos a α/β -hidrolases. Considerando-se os tipos de halogenases já caracterizadas, esses genes poderiam codificar para haloperoxidasas independentes de cofatores (XU; WANG, 2016).

Já para a busca por didomínios A-PCP característicos de NRPS do tipo-II (JAREMKO et al., 2020), utilizou-se os genes presentes nos BGC da balhimicina (GenBank: Y1952.3) e novobiocina (GenBank: AF170880) (Figura 5.4), ambos codificantes para Tyr. No entanto, nenhum didomínio autônomo foi encontrado. Por fim, utilizou-se *vibH* e *capW*, conhecidamente como amida sintases na biossíntese da vibriobactina (GenBank: VCU52150) e capuramicina (GenBank: KP995196) (Figura 5.4), porém nenhum resultado apresentou similaridade significativa.

Considerando-se as análises acima, e a ausência de produção das dibromotirosinas por *P. brasiliensis* Ab134 (sessão 4.2.2), deu-se continuidade com o projeto com o estudo do NRPS-PKS BGC presente no plasmídeo 2 de *P. brasiliensis* Ab134, com o intuito de verificar se este BGC estava sendo expresso nas condições de cultivo aqui utilizadas.

5.3 Análises de bioinformática do NRPS-PKS BGC de *P. brasiliensis* Ab134

Análises por antiSMASH 5.0 (BLIN et al., 2019) identificaram 7 BGCs (Tabela 5.2) no genoma de *P. brasiliensis* Ab134, também representados na Figura 5.2. Análises manuais (blastp) constatarem a presença do BGC responsável pela biossíntese do ácido tropoditiético, TDA (GENG et al., 2008), no plasmídeo 1. O TDA (Figura 1.9) é um antibiótico consistentemente produzido por linhagens de *Pseudovibrio* spp. (CHOUDHARY et al., 2018; HARRINGTON et al., 2014; PENESYAN et al., 2011; RAINA et al., 2016), e tem se mostrado eficiente para inibir

o crescimento de linhagens oportunistas de *Vibrio* spp., geralmente relatadas como patógenos de animais marinhos, como *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* (DUAN et al., 2020), *V. coralliilyticus* e *V. owensii* (RAINA et al., 2016). Acredita-se que o TDA atua como um mecanismo de proteção química do hospedeiro, contribuindo para a relação mutualista entre *Pseudovibrio* spp. e o invertebrado marinho.

Figura 5.4 – Estrutura dos PNs dos quais genes foram utilizados para busca de enzimas putativas para a biossíntese das dibromotirosinas.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 5.2 – BGCs encontrados no genoma *P. brasiliensis* Ab134.

BGC	Classe	Localização	Tamanho (kb)	Módulos
1	Terpeno	Cromossomo	20,8	N/A
2	Bacteriocina	Cromossomo	9,1	N/A
3	Tiopeptídeo	Cromossomo	39,9	N/A
4	Bacteriocina	Cromossomo	10,9	N/A
5	Terpeno	Cromossomo	22,5	N/A
6	PKS	Plasmídeo 2	63,5	PKS-I e PKS-III
7	NRPS-PKS	Plasmídeo 2	71,8	9 NRPS e 1 PKS
8	TDA	Plasmídeo 1	14,0	N/A

Fonte: Autoria própria. N/A: *not applicable*, não se aplica.

Dentre os demais BGCs, o NRPS-PKS BGC (Figura 5.5), localizado no plasmídeo 2, destacou-se por quatro motivos: i) não há relatos de PNs de biossíntese mista NRPS-PKS produzidos por *Pseudovibrio* spp.; ii) este BGC possui dois domínios de tioesterase (TE), uma característica incomum; iii) mostra-se conservado em várias linhagens do gênero *Pseudovibrio*, assim como de *Pseudomonas* spp.; e iv) é similar ao BGC das rimosamidas e detoxinas (Figura 5.6). As detoxinas são PNs produzidos por várias linhagens de *Streptomyces* spp., conhecidas por antagonizar a ação de antibióticos, acreditando-se que estes compostos atuem na comunicação entre bactérias deste gênero (MCCLURE et al., 2016).

Figura 5.5 – Arquitetura dos domínios codificados pelo NRPS-PKS BGC de *P. brasiliensis* Ab134.

Fonte: Autoria própria. Domínios – A: adenilação; PCP: proteína carreadora de peptídeo; C: condensação; C_D: catalisa condensação e epimerização; C_Y: catalisa condensação e ciclização; Ox: catalisa oxidação/redução; TE: tioesterase; KS: cetossintase; KR: cetoreductase; ACP: proteína carreadora de grupo acila.

Figura 5.6 – Estruturas das rimosamidas e detoxinas.

Fonte: Autoria própria.

Análises manuais (blastp) e multigene blast (MEDEMA; TAKANO; BREITLING, 2013) confirmaram a similaridade entre os BGCs presente nos diferentes gêneros (Figura S1). Resumidamente, *Pseudovibrio* spp. sempre apresenta a mesma organização biossintética (Figura 5.7A), enquanto *Pseudomonas* spp. possui duas

variantes desse BGC (Figura 5.7B): i) completa, contendo os genes 4 genes responsáveis pela construção do esqueleto de carbono do PN, ou seja, possui os genes ABC que codificam para NRPS e D para NRPS-PKS, e ii) parcial, contendo 3 genes, BCD, no qual a primeira NRPS está ausente. Já o BGC das rimosamidas e detoxinas, codificados por *Streptomyces* spp. (Figura 5.7C) (MCCLURE et al., 2016), é uma versão ainda mais reduzida, contendo apenas os genes C e D.

Figura 5.7 – Comparação do NRPS-PKS BGC de *P. brasiliensis* Ab134 NRPS e BGCs homólogos de *Pseudomonas* spp. (B) e *Streptomyces* spp. (C). Genes homólogos são mostrados na mesma cor. Aqui são representados os BGC de *Pseudovibrio brasiliensis* Ab134, *Pseudomonas asplenii* NRRL-B733DP, *Ps. entomophila* L48 e *Streptomyces rimosus* NRRL B2660, respectivamente.

Fonte: Autoria própria.

De maneira a se verificar a abrangência desse BGC nos gêneros *Pseudovibrio* e *Pseudomonas*, utilizou-se análises de multigene blast (MEDEMA; TAKANO; BREITLING, 2013) e todos os genomas de *Pseudovibrio* spp. disponíveis no NCBI (n = 23 + Ab134) e genomas completos de *Pseudomonas* spp. (n = 602). Observou-se que esse BGC está presente em 67% das linhagens de *Pseudovibrio*, das quais 75% foram isoladas a partir de esponjas marinhas saudáveis, e em 5% das de *Pseudomonas* spp., das quais 71% foram caracterizadas como patógenos de plantas (Figura 5.8). Do ponto de vista ecológico, a conservação de um BGC em bactérias que colonizam dois nichos ecológicos distintos, sugere que este possa oferecer alguma vantagem adaptativa. Por ser conservado em ambos os gêneros, este BGC foi nomeado *ppp*, para *P*seudovibrio *P*seudomonas *P*eptides. A lista completa das linhagens que possuem este BGC é apresentada na Tabela S4.

Figura 5.8 – Representação gráfica da abrangência dos *ppp* BGCs homólogos nos genomas de *Pseudovibrio* spp. e *Pseudomonas* spp.

Fonte: Autoria própria.

A arquitetura dos domínios NRPS-PKS desse BGC indica que o composto produzido deve conter 9 resíduos de aminoácidos e 1 unidade de acetato ou propionato. Dada a homologia com o BGC das rimosamidas, acredita-se que o composto também é um depsipeptídeo. Além disso, observou-se que os domínios de adenilação são altamente conservados entre todos os BGC homólogos de *Pseudovibrio* spp. e *Pseudomonas* spp. (Figura 5.9 e Figura S2), apresentando singelas variações nos módulos 1, 3 e 7. Também pôde-se constatar que, dentre os BGC de *Pseudovibrio* spp., apenas o BGC da linhagem isolada de um tunicado (Tun.PSC04-5.14) possui um módulo adicional, que codifica para um resíduo de glicina (identificado por um asterisco na Figura 5.9). Por outro lado, notou-se que o domínio de cetoreductase (KR) de quase todos *ppp* BGC parciais de *Pseudomonas* spp., foi identificado como inativo, pertencente a classe C2, embora acredita-se que domínios dessa classe possam atuar como epimerase (KEATINGE-CLAY, 2012).

Outra constatação sobre a organização de domínios, é a presença de um domínio C_D no módulo 3, responsável por catalisar duas reações, condensação e epimerização, podendo adicionar aminoácido com configuração D. Já no módulo 6, identificou-se um domínio C_Y (condensação e ciclização) e um domínio Ox (oxidação). A atuação desses dois domínios em um resíduo de cisteína (predito para o domínio de adenilação) pode resultar em um anel tiazol na estrutura do composto produzido.

A função putativa para os demais genes pertencentes ao *ppp* BGC foi atribuída por homologia (blastp) e os resultados são apresentados na Tabela 5.3.

Figura 5.9 – Arquitetura dos domínios codificados pelo *ppp* BGC de *P. brasiliensis* Ab134 e alguns BGC homólogos representativos de *Pseudovibrio* spp. e *Pseudomonas* spp..

Fonte: Autoria própria. P.: abreviação para *Pseudovibrio*; Ps.: abreviação para *Pseudomonas*. Aminoácidos codificados pelos domínios de adenilação são representados pelo código de uma letra, e X para resíduo que não pode ser predito com acurácia; C2: domínio KR inativo; Símbolos – ✓: presença do domínio; - ausência do domínio; *: presença de um módulo adicional C-A-PCP para G.

As análises por multigene blast também indicaram que os genes *pppH* e *pppI* codificante para proteínas de função desconhecida, assim como *pppK* predito para um dioxigenase dependente de Fe/ α -cetoglutarato, são conservados nos 3 gêneros, enquanto *pppG* (proteína transportadora) está presente apenas nas linhagens que codificam a versão completa do *ppp* BGC. Além disso, diferentemente dos *ppp* BGC de *Pseudomonas* spp., os *ppp* BGC de *Pseudovibrio* spp. mantém, consistentemente, uma tioesterase tipo-II (*pppF*) e uma 4'-fosfopanteteína (4'PP) transferase (*pppE*).

As dioxigenases dependentes de Fe/ α -cetoglutarato, também conhecidas como taurina dioxigenases, catalisam várias reações, como hidroxilação, abertura de anéis, quebra de ligações C-C, epimerização, dessaturação/oxidação, endoperoxidação, desmetilação, formação de anéis e halogenação, utilizando-se de Fe(II) como cofator e α -cetoglutarato como substrato (GAO et al., 2018). No caso das rimosamidas e detoxinas, acredita-se que essa enzima seja responsável pela hidroxilação do resíduo de prolina (Figura 5.6) (MCCLURE et al., 2016).

Tabela 5.3 – Função putativa dos genes do NRPS-PKS BGC de *P. brasiliensis* Ab134 predita por homologia de blastp e domínios enzimáticos preditos por antiSMASH.

Gene	Função homóloga (linhagem) Domínios	E- value	% Query cover/ % Identity
<i>pppA</i>	NRPS (<i>Pseudovibrio denitrificans</i>) A-PCP-C-A-PCP-C-A-PCP	0	99,6/90,5
<i>pppB</i>	NRPS (<i>Pseudovibrio denitrificans</i>) C-A-PCP-C-A-PCP-C-A-PCP-Ox	0	99,7/92,4
<i>pppC</i>	NRPS (<i>Pseudovibrio denitrificans</i>) C-A-PCP-TE	0	100/93,1
<i>pppD</i>	NRPS-PKS (<i>Pseudovibrio denitrificans</i>) A-PCP-C-A-ACP-KS-KR-TE	0	100/90,8
<i>pppE</i>	4'-phosphopantetheinyl transferase (<i>Pseudovibrio denitrificans</i>)	0	99,5/92,9
<i>pppF</i>	Thioesterase type-II (<i>Pseudovibrio</i> sp. Ad26)	0	100/93,4
<i>pppG</i>	MFS transporter (<i>Pseudovibrio</i> sp. Ad26)	0	100/95,4
<i>pppH</i>	GSFA family protein (<i>Pseudovibrio denitrificans</i>)	0	100/94,8
<i>pppI</i>	Hypothetical protein (<i>Pseudovibrio denitrificans</i>)	0	100/93,7
<i>pppJ</i>	Hypothetical protein (<i>Pseudovibrio</i> sp. Ad26)	0	100/85,7
<i>pppK</i>	Iron/ α -ketoglutarate-dependent dioxygenase (<i>Pseudovibrio</i> sp. Ad26)	0	100/95,7

Fonte: Autoria própria.

Outra enzima que se destaca é a tioesterase tipo-2, uma α/β -hidrolase, caracterizada por não ser covalentemente ligada ao complexo enzimático NRPS ou PKS. Estudos apontam que apesar de não ser essencial para a produção do PN, acredita-se que sua atuação implica no rendimento e, portanto, na eficiência de biossíntese do PN, atuando na remoção de intermediários que bloqueiam a rota pela hidrólise das ligações tioéster entre as proteínas carreadoras (PCP, *peptide carrier protein*, para peptídeos, e ACP, *acyl carrier protein*, para policetídeos), seleção de substrato e intermediários, assim como na liberação de produtos incorretos (KOTOWSKA; PAWLIK, 2014; YEH et al., 2004).

Já a 4'PP transferase é uma enzima essencial para o funcionamento de NRPS/PKS, pois é responsável pela modificação pós-traducional de conversão dos domínios PCP/ACP de sua forma *apo* (inativa) para a forma *holo* (ativa), através da transferência do resíduo de 4'PP da Coenzima A (CoA) para o resíduo de serina, conservado em ambas proteínas carreadoras (WALSH; TANG, 2017).

5.4 Desenvolvimento dos mutantes *pppA* e *pppD* e detecção dos produtos de biossíntese do *ppp* BGC

No primeiro mutante substituiu-se o gene *pppA* pelo gene de resistência a kanamicina, obtendo três réplicas biológicas (01, 45 e 47), as quais foram confirmadas por PCR e posterior análise do gel de agarose controle (Figura 5.10), no qual observa-se o amplicon para *pppA*⁻, de tamanho 2,7 kb (seta vermelha) e para WT de 9,8 kb (seta azul). O genoma de *pppA*⁻ (réplica biológica 45) também foi sequenciado por Illumina. Os dados brutos desse sequenciamento (10,7M de *reads* para cada fita de DNA) foram mapeados contra os 7 *contigs* obtidos após a montagem do genoma de *P. brasiliensis* Ab134 WT com os dados Illumina e Nanopore. A Figura 5.11 ratifica os resultados obtidos pela PCR, revelando a ausência de *reads* na região de *pppA* e a ausência de quaisquer outras mutações no restante do genoma.

Figura 5.10 – Foto do gel de agarose obtido após amplificação por PCR da região contendo *pppA*.

Fonte: Jennifer Diaz-Espinosa (aluna de iniciação científica, orientada pela Profa. A. Eustáquio). Os primers utilizados (TP_ctg3-43_f e TP_ctg3-43_r) se ligam nas regiões adjacentes a utilizada para recombinação homóloga.

Figura 5.11 – Representação gráfica do mapeamento do genoma de *P. brasiliensis* Ab134 (linha preta), perante os dados brutos obtidos após sequenciamento por Illumina do genoma de *pppA*⁻ (linha laranja). A cobertura dos *reads* obtidos é apresentada em azul. A anotação dos genes para a linhagem WT é mostrada em cinza.

Fonte: Autoria própria.

Análises por MALDI-TOF DD foram utilizadas para comparar o perfil químico produzido em meio de cultura sólido pelas linhagens *P. brasiliensis* Ab134 WT e o mutante *pppA*. Os dados estão sumarizados na Figura 5.12A-C. Ao comparar o perfil químico de ambos, foi possível identificar cinco produtos do *ppp* BGC presente na linhagem WT e ausentes no *pppA* de m/z 826,258, 844,288, 858,308, 1156,512 e 1170,528. Análises QTOF-MS² (Figura 5.13) mostraram que os compostos de m/z 844,3, 1156,5 e 1170,5 possuem um padrão de fragmentação semelhante (íon da molécula protonada destacado por um asterisco azul, e íons fragmento em vermelho) e compartilham parte do esqueleto de carbono. O composto com m/z 826,2 possivelmente refere-se ao composto de m/z 844,3 ciclizado, justificando a perda de uma molécula de água ($-\Delta 18$), enquanto m/z 858,3 pode corresponder à versão metilada de m/z 844,3 ($+\Delta 14$).

Figura 5.12 – Espectro de massas obtido por MALDI-TOF DD de extratos de *P. brasiliensis* Ab134 WT (B) e mutantes, *pppA* (C) e *pppD* (D). MB (A) foi utilizado como controle negativo.

Fonte: Autoria própria. Todas as réplicas biológicas dos mutantes foram analisadas. Aqui estão representadas a replica biológica *pppA*⁻ 01 e *pppD*⁻ 24.

Figura 5.13 – Espectros de massas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS² dos compostos produzidos pelo *ppp* BGC de *P. brasiliensis* Ab134 de m/z 844,3 (A), 1156,5 (B), e 1170,5 (C).

Fonte: Autoria própria.

Ao analisarmos a organização de domínios do *ppp* BGC e a previsão para os aminoácidos codificados pelos domínios de adenilação da NRPS, suspeitou-se de que os compostos menores (m/z 826, 844 e 858) poderiam ser o produto da expressão dos genes *pppABC*, dado que o gene *pppC* abriga um domínio de tioesterase (Figura 5.5), e assim poderia ser responsável pela liberação de um heptapeptídeo. Consequentemente os compostos maiores (m/z 1156 e 1170) seriam os depsipeptídeos produzidos pelas enzimas codificadas pelos genes *pppABCD*.

Esta hipótese foi investigada pela geração de mutantes em que o gene *pppD* foi substituído pelo gene de resistência a kanamicina (*pppD^r*). A Figura 5.14 mostra a obtenção de duas réplicas biológicas (24 e 67) para *pppD^r*, e o tamanho esperado do amplicon de *pppD^r* (4,0 kb, seta vermelha) e WT (11,8 kb, seta azul). Análises por MALDI-TOF DD comprovaram que *pppD^r* produziu apenas o composto com m/z 844,3 (Figura 5.12D).

Figura 5.14 – Foto do gel de agarose obtido após amplificação por PCR da região contendo *pppD*.

Fonte: Autoria própria. Os primers utilizados (oLI23 e oLI24) se ligam nas regiões adjacentes a utilizada para recombinação homóloga.

Para complementar esses dados, obteve-se dados de imageamento por espectrometria de massas de imagem (MALDI-TOF-IMS), que evidenciaram que o heptapeptídeo m/z 844,3 é excretado, enquanto depsipeptídeos m/z 1156,5 e 1170,5 são associados às células (Figura 5.15). Isso corrobora com o fato dos depsipeptídeos não terem sido observados anteriormente em cultivos em meio líquido, dado que as células não foram extraídas (sessão 4.2.8).

Figura 5.15 – Representação gráfica da localização dos compostos produzidos por *P. brasiliensis* Ab134 WT e mutantes, *pppA* e *pppD* (B). Dados obtidos por análises por MALDI-TOF IMS.

Fonte: Autoria própria. Aqui estão representadas a replica biológica *pppA*⁻ (01) e *pppD*⁻ (24), cultivadas por 2 dias, à 30 °C, em placa de MA. Inóculo padronizado por OD₆₀₀.

5.5 Bioensaios de motilidade bacteriana (*swarming* e *swimming*), produção de surfactantes e formação de biofilme para *P. brasiliensis* Ab134 WT e mutantes *pppA* e *pppD*

Após o desenvolvimento do mutante *pppA*, observou-se que o diâmetro das colônias bacterianas dessa linhagem era consideravelmente menor do que o diâmetro das colônias da linhagem WT (Figura 5.16). O mesmo fato pode ser constatado na Figura 5.15, na qual a quantidade de células inoculadas foi padronizada para as diferentes cepas, e as colônias são nitidamente de tamanhos diferentes. Assim, suspeitou-se que o produto codificado pelo *ppp* BGC possa influenciar no fenótipo de motilidade bacteriana.

Figura 5.16 – Foto das linhagens *P. brasiliensis* Ab134 WT e *pppA*⁻ em placas de MA estriadas (A) e ampliação das colônias evidenciando a diferença de diâmetro (B).

Fonte: Alessandra S. Eustáquio.

Sabe-se que linhagens de *Pseudovibrio* spp. contêm os genes necessários para a produção de flagelos (ALEX; ANTUNES, 2015; SERTAN-DE GUZMAN et al., 2007; SHIEH; LIN; JEAN, 2004), e a sua presença foi comprovada por imagens de microscopia de transmissão eletrônica (*Transmission electron microscopy*, TEM) em *P. ascidiaceicola* (FUKUNAGA et al., 2006). Existem dois mecanismos de motilidade bacteriana impulsionados por flagelos, *swimming* (em meio líquido) e *swarming* (em superfícies sólidas), os quais já foram descritos tanto para linhagens de α - quanto de γ -Proteobactérias (KEARNS, 2010).

A habilidade de *swarming* pode ser estudada em bioensaio utilizando-se meio de cultura semissólido, contendo aproximadamente 0,5 % de ágar, cerca de um terço da quantidade de ágar em meio sólido padrão. Além disso, sabe-se que fatores como meio de cultivo, temperatura, umidade e tipo de ágar podem influenciar na observação desse fenótipo em laboratório (HARSHEY, 2003; MATTINGLY et al., 2018).

O primeiro teste propôs-se manter constante o meio de cultura (caldo marinho, MB) e a temperatura de incubação e avaliar apenas a influência do ágar, testando-se duas marcas, Bacto ou Eiken. Constatou-se que *P. brasiliensis* Ab134 é capaz de *swarm* apenas em ágar Eiken (Figura 5.17), ocupando toda a superfície da placa em 40 h (Figura 5.18).

Figura 5.17 – Fotos representativas do bioensaio de *swarming* para *P. brasiliensis* Ab134 comparando-se os ágar da marca Bacto (A/C) e Eiken (B/D).

Fonte: Autoria própria.

Figura 5.18 – Evolução do *swarming* de *P. brasiliensis* Ab134 em placa de meio semissólido de MB + 0,5 % ágar Eiken, incubada à 30 °C, à 15, 20, 24 e 40 h após o inóculo.

Fonte: Autoria própria.

Paralelamente observou-se que uma gota de água (realçada com o corante cristal-violeta) ocupa uma superfície maior no meio semissólido contendo ágar Eiken (Figura 5.17D), do que no meio com ágar Bacto (C). Esse fato constata que a tensão superficial no ágar Eiken é menor do que a do ágar Bacto, podendo ser o fator responsável pela capacidade de *swarm* de *P. brasiliensis* Ab134 apenas no ágar Eiken.

Com o bioensaio estabelecido, comparou-se a capacidade de *swarm* de *P. brasiliensis* Ab134 WT e dos mutantes *pppA* e *pppD*, padronizando os inóculos e utilizando estoques criogênicos de $OD_{600} \approx 1,0$. Todas as réplicas biológicas foram testadas em duplicadas técnicas. A Figura 5.19 sumariza os resultados obtidos, na qual pode-se notar que todas as linhagens foram capazes de *swarm*, embora *P. brasiliensis* Ab134 WT e *pppD*⁻ ocuparam toda a superfície da placa em 48 h, enquanto o *pppA*⁻ ocupou apenas metade dessa área no mesmo período. Os compostos produzidos por cada cepa e detectados por espectrometria de massas também são representados na Figura 5.19.

Figura 5.19 – Fotos representativas comparando-se o fenótipo de *swarming* de *P. brasiliensis* Ab134 WT e os mutantes *pppA* e *pppD*, após 24h e 48h de crescimento à 30 °C.

Fonte: Autoria própria. Cada círculo representa um precursor biossintético: os resíduos codificados por *pppABC* são simbolizados por círculos pretos, enquanto os resíduos codificados por *pppD* em vermelho.

O mesmo padrão de crescimento foi observado em bioensaios de *swimming*, como mostrado na Figura 5.20, assim como para todas as réplicas biológicas (Figura S3). Esses resultados sugerem que os heptapeptídeos, codificados pelos genes *pppABC* (m/z 826,3, 844,3 e 858,3), podem promover a motilidade flagelar, dado que na sua ausência, a capacidade de *swarm* e *swimming* são substancialmente reduzidas.

Figura 5.20 – Fotos representativas comparando-se o fenótipo de *swimming* de *P. brasiliensis* Ab134 WT e os mutantes *pppA* e *pppD*, após 24h e 48h de crescimento à 30 °C.

Fonte: Autoria própria. Cada círculo representa um precursor biossintético: os resíduos codificados por *pppABC* são simbolizados por círculos pretos, enquanto os resíduos codificados por *pppD* em vermelho.

Com o objetivo de se verificar se os heptapeptídeos produzidos por *P. brasiliensis* Ab134 WT e *pppD*⁻ apresentam atividade surfactante, uma classe de compostos que auxilia na redução da tensão superficial e consequentemente promove o fenótipo de *swarming*, realizou-se um ensaio de colapso de gota. No entanto, observou-se que nenhuma das culturas ou extratos apresentam essa ação (Figura 5.21). Assim acredita-se que esses compostos possam atuar como sinalizadores na comunicação química entre as células bacterianas, ao invés de influenciar em uma propriedade física do movimento.

Figura 5.21 – Foto comparando a ação surfactante de cultura de células (A) e extratos (B) de *P. brasiliensis* Ab134 WT e mutantes *pppA* e *pppD*. Solução de 0,1% Tween 20 foi utilizada como controle positivo e água como controle negativo.

Fonte: Autoria própria. Amostras foram coradas com cristal violeta (A) ou azul de algodão (B).

Por outro lado, como a motilidade flagelar é um comportamento oposto à formação de biofilme (GUTTENPLAN; KEARNS, 2013), também avaliou-se esse fenótipo para as linhagens *P. brasiliensis* Ab134 WT e os mutantes *pppA* e *pppD*, considerando todas as réplicas biológicas em seis réplicas técnicas (Figura 5.22 e Tabela S5). Observou-se que todas as cepas são capazes de formar biofilme, no entanto *pppA*⁻, que apresentou motilidade flagelar reduzida, possui um fenótipo de formação de biofilme mais pronunciado quando comparado com *P. brasiliensis* Ab134 WT ou com *pppD*⁻. Curiosamente, o mutante *pppD*, que não mostrou motilidade flagelar reduzida, apresentou redução na formação de biofilme.

Figura 5.22 – Resultado do bioensaio de formação de biofilme para de *P. brasiliensis* Ab134 WT e mutantes *pppA* e *pppD* em dois períodos de crescimento (24h e 48 h), utilizando-se o mesmo inóculo. A medida dos mutantes considera média de absorbância de todas as réplicas biológicas para *pppA*⁻ e *pppD*⁻.

Fonte: Autoria própria. Análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o teste de Tukey (intervalo de confiança de 95%) no software OriginPro 8.5. Cada círculo representa um precursor biossintético: os resíduos codificados por *pppABC* são simbolizados por círculos pretos, enquanto os resíduos codificados por *pppD* em vermelho.

De acordo com os resultados dos bioensaios, motilidade flagelar, atividade surfactante e formação de biofilme, avaliou-se a hipótese de que a família de heptapeptídeos (m/z 826-858) pode promover motilidade flagelar e inibir a formação de biofilme. Já a função para os depsipeptídeos (m/z 1156-1170) ainda é desconhecida.

Para melhor investigar-se essa hipótese e testar se os peptídeos podem ter um papel na regulação da motilidade flagelar e formação de biofilme de *P. brasiliensis* Ab134, o laboratório da Prof. Eustáquio comparará o transcriptoma das linhagens WT, *pppA*⁻ e *pppD*⁻ por RNAseq, a fim de avaliar expressão gênica de cada cepa. Paralelamente, imagens de microscopia eletrônica de transmissão também serão obtidas para comparar a morfologia entre as mesmas linhagens bacterianas. Espera-se que a combinação desses resultados elucide os mecanismos conservados que *Pseudovibrio* spp. utiliza para coordenar os fenótipos de *swarm* e formação de biofilme.

5.6 Avaliação de metodologias de cultivo e extração para isolamento de compostos produzidos por *P. brasiliensis* Ab134

Após o insucesso em se obter os depsipeptídeos produzidos pelo *ppp* BGC a partir do extrato do meio de cultivo líquido (27 L, sessão 4.2.2) de *P. brasiliensis* Ab134, alguns experimentos foram realizados para determinar qual a abordagem mais apropriada para obter esses compostos.

Conforme os resultados mostrados acima, os produtos do *ppp* BGC são facilmente detectados em culturas utilizando-se meio de cultura sólido, no entanto, o uso deste inclui alguns desafios por ser um extrato aquoso, demandando mais tempo para eliminar todo o conteúdo de água e ser um extrato complexo, dada a presença de muitos componentes do meio de cultivo, e componentes celulares, como proteínas e lipídeos.

Para contornar o uso deste método de cultivo, um primeiro teste incluiu adicionar bolas de algodão ao meio líquido, com o intuito de mimetizar o ambiente em que essa bactéria se encontra, associada a esponja marinha, como descrito anteriormente (TIMMERMANS et al., 2019). Observou-se que os depsipeptídeos (m/z 1156-1170) foram detectados apenas no extrato das células aderidas ao algodão,

enquanto os heptapeptídeos (m/z 826-858) puderam ser detectados em todos os extratos (Figura 5.23), incluindo nos extratos de *P. brasiliensis* Ab134 em meio líquido na ausência de algodão.

Figura 5.23 – Espectro de massas obtido por MALDI-TOF DD de extratos de *P. brasiliensis* Ab134 em cultivo contendo bolas de algodão (A) e ampliação do espectro na região entre 1150-1180 Da (B).

Fonte: Autoria própria. Tradução dos termos em inglês – *cotton*: algodão; *cells*: células; *resins*: resinas. Em azul, extrato metanólico das células aderidas no algodão; em verde, extrato metanólico das células presentes no meio de cultura líquido; em roxo, extrato acetato de etila do meio de cultivo após a remoção das células; e em marrom, extrato da mistura de resinas adicionada a fração aquosa da partição líquido-líquido com AcOEt.

Paralelamente, a fim de comparar o perfil químico obtido com o cultivo em meio líquido, cultivou-se *P. brasiliensis* Ab134 em meio de cultura semissólido, no qual o crescimento dessa linhagem é mais rápido, dada a expressão do fenótipo de *swarming*. A Figura 5.24 evidencia que, apesar dos compostos de interesse serem detectados em ambas metodologias, o extrato obtido a partir do cultivo em meio semissólido possui uma quantidade maior dos produtos do *ppp* BGC, principalmente dos depsipeptídeos com m/z 1156 e m/z 1170. Portanto, optou-se por escalonar o cultivo de *P. brasiliensis* Ab134 em meio semissólido.

Figura 5.24 – Espectro de massas obtido por MALDI-TOF DD de extratos de *P. brasiliensis* Ab134 em cultivo contendo bolas de algodão (em vermelho) e a partir de culturas em meio semissólido (em azul).

Fonte: Autoria própria.

5.7 Estratégias para o isolamento das pseudovibriamidas

O isolamento dos compostos produzidos pelo *ppp* BGC foram um desafio, por três motivos: 1) o baixo rendimento da produção desses peptídeos em condições padrão de cultivo em laboratório, o qual foi contornado pelo uso de meio de cultura semissólido; 2) o produto completo do *ppp* BGC está presente majoritariamente dentro das células de *P. brasiliensis* Ab134, o que exigiu aperfeiçoar o protocolo de extração; e 3) os compostos são solúveis em água, que exige o uso de estratégias cromatográficas diferenciadas para seu isolamento e purificação.

Dentre as estratégias utilizadas para fazer um *clean-up* do extrato para obter-se frações em que os compostos de interesse pudessem ser observados em detector UV, a cromatografia de exclusão por tamanho (Biogel-P2, selecionada pela possibilidade de utilizar-se uma mistura de H₂O/MeOH 4:1) foi a mais efetiva, quando comparada com a complexidade de frações obtidas após o fracionamento em coluna de fase reversa (C18, C8 ou Fenila). Considerando-se as fases estacionárias utilizadas em fracionamentos por HPLC, destaca-se a utilização da coluna HILIC para o isolamento dos peptídeos produzidos por *P. brasiliensis* Ab134, que permitiu uma excelente resolução na separação dos compostos de m/z 844 e 826, comparável com a resolução da coluna C18-PFP. A coluna de fase estacionária Fenila também se mostrou a mais eficiente para a separação dos compostos com m/z 1142-1170. Em todas as etapas. A acidificação da fase móvel foi decisiva para a resolução dos picos cromatográficos.

5.8 Determinação estrutural da pseudovibriamida A1

O composto presente na fração F2B67D3 (5,5 mg) foi obtido como um sólido amorfo branco, com fórmula molecular $C_{36}H_{49}N_{11}O_{11}S$ estabelecida por HRMS-ESI⁺ (Figura 5.25A) observando-se o íon $[M + H]^+$ em m/z 844,3389 (calculado para 844,3412, erro de -2,3 ppm), concordando com o espectro de HRMS-ESI⁻ (Figura 5.25B), no qual obteve-se o íon $[M - H]^-$ em m/z 842,3253 (calculado para 842,3255, erro de -0,2 ppm), e indicando 18 graus de insaturação (IDH, índice de deficiência de hidrogênio).

Figura 5.25 – Espectro de massas do composto presente na fração F2B67D3. A) HRMS-ESI⁺ e B) HRMS-ESI⁻.

Fonte: Autoria própria.

A análise dos espectros de RMN de 1H (Figura S4), DEPTQ (^{13}C , Figura S5) e HSQC (1J 1H - ^{13}C , Figura S6) indicaram a presença de seis grupos NH em δ_H 6,42, 6,79, 7,72, 7,81, 8,15 e 8,43, assim como cinco sinais correspondentes a hidrogênios ligados a C_α de aminoácidos, δ_H 4,29 (δ_C 48,32), δ_H 4,30 (δ_C 54,09), δ_H 4,38 (δ_C 51,86), δ_H 4,50 (δ_C 50,37) e δ_H 5,32 (δ_C 58,47), indicando a presença de ao menos cinco aminoácidos. Também pôde-se observar sinais para um anel aromático *para*-substituído com δ_H 6,67 (δ_C 115,06) e δ_H 6,97 (δ_C 130,36), ambos dupletos com $J =$

8,0 Hz, além de dois dubletos correspondentes a grupos metila com δ 1,23 (δ_C 17,99; $J = 6,9$ Hz) e δ_H 1,59 (δ_C 12,62; $J = 6,9$ Hz). O espectro de DEPTQ também mostrou a presença de grupos carboxila de amida ou ácido carboxílico entre os δ_C 160,5-173,8.

Considerando-se a natureza peptídica do composto, a análise das correlações entre C e os H_α e/ou NH no espectro de HSQC-TOCSY (Figura S7) permitiram a identificação de cinco resíduos de aminoácidos, uma vez que o acoplamento entre 1H com ^{13}C não é transmitido através de heteroátomos (Figura 5.26): tirosina (Tyr), arginina (Arg), glutamina (Gln), prolina (Pro) e alanina (Ala), os quais também foram confirmados pelas correlações correspondentes nos espectros de COSY (Figura S8) e HMBC (Figura S9). Esses aminoácidos correspondem à predição por bioinformática para os módulos 1, 4, 7 e 5, respectivamente. O resíduo de Ala é provavelmente produto do módulo 3, o qual não teve o resíduo de aminoácido predito.

Figura 5.26 – Correlações nos espectros de HSQC-TOCSY, COSY e HMBC para determinar a presença dos aminoácidos Tyr, Arg, Gln, Pro e Ala no composto presente na fração F2B67D3.

Fonte: Autoria própria.

Considerando-se as análises de bioinformática apresentadas na sessão 5.3, espera-se que o módulo 6 (Figura 5.9) do *ppp* BGC codifique uma Cys, que será ciclizada, pelo domínio de condensação C_y , formando um anel tiazolina (Figura 5.27A), que posteriormente será oxidado pelo módulo Ox, formando o anel tiazol (thz) (Figura 5.27A). A observação de um hidrogênio/carbono metínico com δ_H 8,16 (δ_C

123,98) e correlações no espectro de HMBC com os carbonos quaternários com δ_C de 149,12, 160,53 e 173,67 (anteriormente dado como o carbono carbonílico da amida da Pro, Figura 5.26), estabeleceram o sistema Pro-thz (Figura 5.27B) no composto presente na fração F2B67D3.

Figura 5.27 – Mecanismo hipotético para a formação do heterociclo tiazol (A). Correlações nos espectros de HMBC para determinar o sistema Pro-thz presente no composto na fração F2B67D3 (B).

Fonte: Autoria própria.

As correlações nos espectros COSY e HSQC-TOCSY entre o quarteto ($J = 6,9$ Hz) do hidrogênio metínico com δ_H 5,95 (δ_C 121,88) e o duplete dos hidrogênios metílicos com δ_H 1,59 (δ_C 12,62), indicou a presença de um resíduo de ácido desidroaminobutírico (Dhb, Figura 5.28), correspondendo a cadeia lateral de uma Thr desidratada, codificada pelo modulo 2. A estereoquímica desse resíduo foi determinada como z, levando-se em conta a correlação entre NH_{Tyr} (δ_H 7,81) e CH_3-Dhb (δ_H 1,59), no espectro de ROESY (Figura S10).

Figura 5.28 – Correlações nos espectros de HSQC-TOCSY, COSY e HMBC para determinar a presença resíduo de Dhb no composto presente na fração F2B67D3.

Fonte: Autoria própria.

A conectividade entre os aminoácidos foi determinada utilizando-se o espectro de HMBC, observando-se os acoplamentos dos NH e/ou H α com o CO do resíduo vizinho, estabelecendo-se as sequências parciais Dhb-Ala-Arg e Pro-thz-Gln (Figura 5.29).

Figura 5.29 – Correlações nos espectros de COSY e HMBC para determinar a conectividade entre os resíduos de aminoácidos no composto presente na fração F2B67D3.

Fonte: Autoria própria.

Observou-se que o NH_{Tyr} (δ_H 6,42) não se correlaciona com o CO_{Dhb} (δ_C 164,97), assim como o NH_{Dhb} (δ_H 7,81) também não se correlaciona com CO_{Tyr} (δ_C 173,51). Ao invés disso, o H α -Tyr (δ_H 6,42) e o NH_{Dhb} (δ_H 7,81) se correlacionam com o um carbono carbonílico em δ_C 155,16.

A análise do espectro de massas MS² do íon m/z 844,3 (Figura 5.30) indicou a perda de um resíduo completo de Tyr, gerando o íon fragmento de m/z 663,2673 (calc. 663,2673, erro de 0 ppm). Já o íon fragmento de m/z 637,2866 (calc. 637,2875, erro de -1,4 ppm), sugere a perda de Tyr+CO. Isso seria possível na presença de um grupo ureia conectando os resíduos de Tyr e Dhb. O espectro de RMN 2D HSQC de ¹⁵N (Figura S11) indicou o acoplamento entre o NH_{Tyr} (δ_H 6,42) com um nitrogênio de δ_N 88,51, e entre NH_{Dhb} (δ_H 7,81) com um nitrogênio de δ_N 92,17, ambos deslocamentos químicos característicos de nitrogênio de ureia, corroborando com essa hipótese. Deste modo, foi possível propor o fragmento parcial Tyr-CO-Dhb-Ala-Arg (Figura 5.31A).

Análises complementares do espectro de massas MS² do íon m/z 844,3 (Figura 5.30) confirmaram as sequências parciais anteriormente propostas (Figura 5.31B e Tabela 5.4), assim como as conectividades entre elas, indicadas pela presença do par

de íons-fragmento formados pela clivagem da ligação peptídica entre os aminoácidos Arg e Pro, resultando nos íons de m/z 518, (calc. 663,2673, erro de 0 ppm) e m/z 327, (calc. 663,2673, erro de 0 ppm), correspondentes aos íons fragmentos N e C-terminal, respectivamente. Assim, o heptapeptídeo presente na fração F2B67D3 apresenta a sequência Tyr-CO-Dhb-Ala-Arg-Pro-thz-Gln. A estrutura proposta também concorda com o IDH calculado para fórmula molecular $C_{36}H_{49}N_{11}O_{11}S$.

Figura 5.30 – Espectros de massas obtido por UPLC-QTOF-MS² para o composto presente na amostra F2B67D3 (m/z 844,3).

Fonte: Autoria própria.

Figura 5.31 – Relações para determinar a estrutura do composto presente na fração F2B67D3. A) Correlações nos espectros de COSY, HMBC e HSQC ¹⁵N para determinar a presença da conexão ureia entre os resíduos de Tyr e Dhb. B) Esquema de fragmentação.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 5.4 – Íons fragmentos originados pela quebra da ligação amida identificados em análise por UPLC-QTOF-MS² para o composto presente na amostra F2B67D3 (*m/z* 844,3).

		<i>m/z</i> acurada	<i>m/z</i> exata	Erro (ppm)
<i>b</i>₂	C ₁₄ H ₁₅ N ₂ O ₅ ⁺	291,0978	291,0981	-1,0
<i>b</i>₃	C ₁₇ H ₂₀ N ₃ O ₆ ⁺	362,1354	362,1352	0,6
<i>b</i>₄	C ₂₃ H ₃₂ N ₇ O ₇ ⁺	518,2342	518,2363	-4,1
<i>y</i>₂'	C ₉ H ₁₂ N ₃ O ₄ S ⁺	258,0548	258,0549	-0,4
<i>y</i>₃	C ₁₃ H ₁₉ N ₄ O ₄ S ⁺	327,1130	327,1127	0,9
<i>y</i>₄	C ₁₉ H ₃₁ N ₈ O ₅ S ⁺	483,2151	483,2138	2,7
<i>y</i>₅	C ₂₂ H ₃₆ N ₉ O ₆ S ⁺	554,2515	554,2509	1,1
<i>y</i>₆	C ₂₆ H ₄₁ N ₁₀ O ₇ S ⁺	637,2866	637,2880	-2,2
<i>y</i>₆'	C ₂₇ H ₃₉ N ₁₀ O ₈ S ⁺	663,2667	663,2673	-0,9

Fonte: Autoria própria.

A análise avançada de Marfey (FREIRE et al., 2019; SALIB; MOLINSKI, 2017), comparando-se o tempo de retenção (*t_R*) dos derivados da hidrólise do composto presente na fração F2B67D3, com os *t_R* dos padrões de aminoácidos derivatizados com L ou D-FDTA em análises por UPLC-MS permitiram estabelecer a configuração absoluta de todos os resíduos de aminoácidos presentes no peptídeo da fração F2B67D3: L-Tyr, L-Ala, L-Arg, L-Pro, e L-Gln (Figuras S12-16).

A Tabela 5.5 apresenta a atribuição final dos sinais de RMN de ¹H, ¹³C e ¹⁵N para o composto **1**, nomeado pseudovibriamida A1.

Tabela 5.5 – Dados de RMN de ^1H , DEPTQ ^{13}C e ^{15}N da amostra F2B67D3 em $\text{DMSO}-d_6 + \text{TFA}$ (^1H : 900 MHz, ^{13}C : 226 MHz, ^{15}N : 91 MHz).

Resíduo	Posição	δ_{C} (tipo)	δ_{H} (J em Hz)	δ_{N} (tipo)
L-Tyr	CO_2H	173,51 (CO)		
	NH		6,42 (s)	88,51 (ureia)
	CO	155,16 (CO)		
	α	54,09 (CH)	4,30 (m)	
	β	36,68 (CH_2)	2,83 (dd, 6,7 e 6,5); 2,89 (dd, 5,2 e 4,9)	
	aromático	1: 127,00 (C)		
		2,2': 130,36 (CH)	6,97 (d, 8,0)	
		3,3': 115,06 (CH)	6,67 (d, 8,0)	
		4: 156,11 (COH)		
z-Dhb	NH		7,81 (s)	92,17 (ureia)
	CO	164,97 (CO)		
	α	131,95 (C)		
	β	121,88 (CH)	5,95 (q, 6,6)	
	γ	12,62 (CH_3)	1,59 (d, 6,9)	
L-Ala	NH		7,72 (s)	
	CO	172,37 (CO)		
	α	48,32 (CH)	4,29 (m)	
	β	17,99 (CH_3)	1,23 (d, 6,9)	
L-Arg	NH		8,15 (d, 7,1)	
	CO	170,65 (CO)		
	α	50,37 (CH)	4,50 (dt, 7,7 e 5,5)	
	β	28,10 (CH_2)	1,53 (m); 1,76 (m)	
	γ	24,93 (CH_2)	1,53 (m)	
	δ	40,43 (CH_2)	3,09 (m); 3,12 (m)	
	guanidina		2,53 (s)	
		156,8 (C)		
L-Pro-thz			7,35 (s)	
			7,63 (s); 7,69 (s)	
	α	58,47 (CH)	5,32 (dd, 8,0 e 2,1)	
	β	31,47 (CH_2)	2,18 (m); 2,24 (m)	
	γ	24,10 (CH_2)	1,97 (m); 2,00 (m)	
	δ	46,76 (CH_2)	3,73 (m)	
	CO	160,53 (CO)		
	α'	149,12 (C)		
L-Gln	β'	123,98 (CH)	8,16 (m)	
	δ'	173,67 (C)		
	NH		8,43 (d, 7,9)	
	CO_2H	173,22 (CO)		
	α	51,86 (CH)	4,38 (m)	
	β	26,36 (CH_2)	1,97 (m); 2,11 (m)	
	δ	31,42 (CH_2)	2,15 (m)	
	CONH_2	173,8 (CO)	6,79 (s)	110,42 (amida prim.)

Fonte: Autoria própria.

5.9 Análises de bioinformática dos domínios do *ppp* BGC responsáveis pela biossíntese da pseudovibriamida A1 por *P. brasiliensis* Ab134

Por ser biossintetizada por uma NRPS, a estrutura da pseudovibriamida A1 (1) apresenta algumas características incomuns para essa classe de compostos: i) uma conexão ureia entre dois aminoácidos, função observada em poucas famílias de PNs; ii) um resíduo de Dhb, comumente encontrado em lipopeptídeos e peptídeos ribossomais (RiPP); e iii) um sistema bicíclico contendo um resíduo de prolina e um heterociclo tiazol, majoritariamente produzido por RiPP.

Desse modo, buscou-se nos bancos de dados SciFinder (ACS-SOLUTION, 2020) e Norine (CABOCHE et al., 2008), compostos representativos contendo as funções acima. Para os PNs em que o BGC já tenha sido reportado na literatura e presente no banco de dados MIBiG (KAUTSAR et al., 2019), o BGC foi analisado por antiSMASH (BLIN et al., 2019), e os resultados exportados para o software Geneious Prime. As relações evolutivas dos domínios biossintéticos foram avaliadas pelo alinhamento das sequências de aminoácidos utilizando-se MUSCLE (EDGAR, 2004) e visualizadas pela construção de árvores filogenéticas pelo Geneious Tree Builder (KEARSE et al., 2012).

Conexão entre aminoácidos por um grupo ureia

A presença de um grupo ureia na cadeia peptídica da pseudovibriamida A1 não é um caso isolado na literatura. Algumas classes de peptídeos apresentam uma polaridade reversa da cadeia da NRPS, na qual uma ligação ureia é introduzida entre os mais variados resíduos de aminoácidos (Tabela S6). Dentre esses, o BGC de alguns desses PNs estão reportados na literatura (Figura 5.32). Os genes responsáveis pela formação dessa conexão na siríngolina C foram investigados em ensaios *in vitro*, indicando que o próprio domínio de condensação da NRPS catalisa essa ligação utilizando bicarbonato/CO₂ como substrato (Figura 5.33). Baseando-se nos átomos de oxigênio isotopicamente marcados incorporados no produto final, dois mecanismos foram propostos, ambos partindo de um intermediário cíclico. Na rota a, ocorre a formação de um N-carboxianidro não covalentemente ligado ao módulo enzimático, enquanto na rota b, o intermediário é capturado por um sítio nucleófilo do módulo enzimático, provocando a quebra da ligação éster antes do ataque da amina

e subsequente formação da ligação ureia (IMKER; WALSH; WUEST, 2009; RAMEL et al., 2009).

Figura 5.32 – Estruturas de peptídeos não-ribossomais representativos de suas classes que contém o uma conexão ureia (destacada em azul) em sua estrutura e que tem BGC reportado na literatura.

Fonte: Autoria própria.

Figura 5.33 – Mecanismo hipotético catalisado pelo gene SylC para a formação da conexão via ureia no compostoiringolina C.

Fonte: Adaptado de Imker, et al. (2009).

Para inferir relações evolutivas entre domínios de condensação que catalisam a formação da conexão via ureia com domínios que catalisam apenas a formação da ligação peptídica, comparou-se a sequência de aminoácidos destes domínios presentes nos BGCs dos compostos apresentados na Figura 5.32. A árvore filogenética (Figura 5.34) destaca que o domínio de condensação presente no módulo 2 do *ppp* BGC de *P. brasiliensis* Ab134, bem como de *Ps. asplenii* ATCC23835 e *Ps. fuscovaginae* LMG2158 agrupam juntamente com domínios de condensação responsáveis pela formação da ligação ureia em outros PNs, corroborando com os dados espectrométricos e espectroscópicos da pseudovibriamida A1.

Sabe-se que a funcionalidade dos domínios de condensação é dependente da presença do motivo enzimático (*motif*) HHxxxDG (STACHELHAUS et al., 1998). Análises do alinhamento das sequências de aminoácidos destes domínios ainda apontaram para a conservação de dois aminoácidos adicionais a este *motif* (EHHxxHDG, Figura 5.35), sugerindo que a conservação destes pode ser essencial para a formação de uma conexão via ureia, ao invés de uma ligação amida.

Figura 5.34 – Análise filogenética dos domínios de condensação de BGCs que produzem peptídeos não-ribossomais com conexão via ureia.

Fonte: Autoria própria.

Figura 5.35 – Visualização do alinhamento da sequência de aminoácidos dos domínios de condensação dos BGCs de PNs que contém uma conexão via ureia. Destaca-se os domínios responsáveis pela formação desta ligação.

Fonte: Autoria própria.

Resíduo Dhb

Existem dezenas de peptídeos contendo Dhb em sua estrutura. No entanto, apenas alguns foram caracterizados como peptídeos não-ribossomais de origem bacteriana (Tabela S7): lipopeptídeos (hassallidinas, fuscopeptinas, siringomicinas, siringopeptinas, siringostatinas, tolaasinas, sessilinas, corpeptinas, cormicinas, jessepeptinas, stendomicina/pantomicina e puwainaficinas), a nodularina, as microcistinas, o bogorol e o antibiótico FR901228, sendo alguns destes representados na Figura 5.36.

Apesar do fato de que alguns destes PNs já contarem com a identificação do seu BGC (Tabela S7), o gene responsável por codificar a enzima responsável pela desidratação de resíduos de Thr levando à formação de Dhb ainda é desconhecido.

Análises filogenéticas do BGC das microcistinas sugerem que o domínio de condensação presente em MycA seja responsável pela desidratação dos resíduos de Ala e Thr, considerando-se modificações no *motif* HHxxxDG (CHRISTIANSEN et al., 2003; TILLET et al., 2000). Levando-se em conta essa hipótese, comparou-se a sequência de aminoácidos dos domínios de condensação do BGC das microcistinas e da nodularina já reportados na literatura, com os domínios do *ppp* BGC de *P. brasiliensis* Ab134.

Figura 5.36 – Peptídeos não-ribossomais que contém o resíduo Dhb em seu esqueleto, destacado em verde.

Fonte: Autoria própria.

A árvore filogenética (Figura 5.37) destaca que o domínio de condensação presente no módulo 3 do *ppp* BGC de *P. brasiliensis* Ab134, bem como de *Ps. asplenii* ATCC23835 e *Ps. fuscovaginae* LMG2158 agrupam juntamente com domínios de condensação que catalisam a desidratação de Ala e Thr nas microcistinas e nodularina. Nesta análise também pode-se notar que o terceiro ramo é responsável pela formação de aminoácidos epimerizados.

Figura 5.37 – Análise filogenética dos domínios de condensação dos *ppp*, *mcy* e *nod* BGCs.

Fonte: Autoria própria.

[illegible]

Fonte: Autoria própria.

Sistema Pro-thz

O sistema bicíclico Pro-thz é encontrado em apenas alguns PNs (Figura 5.39), todos obtidos a partir de amostras do ambiente marinho, como ascídias (ARRAULT et al., 2002), algas vermelhas (TAN et al., 2000) e cianobactérias (LAWTON; MORRIS; JASPARS, 1999; LUESCH et al., 2000; MCINTOSH et al., 2013). Em todos os casos, determinou-se a estereoquímica do aminoácido como L-Pro, assim como observado para pseudovibriamida A1.

Este heterociclo aromático é encontrado conectado aos mais diversos aminoácidos (Tabela S8), como Gly (micromida, colibactina e pagoamida), Ala (guineamidas e obianamida), Ser (trichamida), Val (antalídeo), Leu (micrococcina), Ile (goadsporina e microciclâmina), Asn (klebsazolicina) e Phe (haligramida, waiakeamida e patellamide), ou como parte de peptídeos complexos (bottromicina, nocatiacina, tiopeptinas, tiostreptona, nosiheptida, bleomicina), ou mesmo em PNs de biossíntese mista (epotilona).

Figura 5.39 – Peptídeos que apresentam o sistema Pro-thz em seu esqueleto, destacado em roxo.

Fonte: Autoria própria.

Dentre os compostos listados na Tabela S8, apenas a epotilona, a colibactina e o antalideo (Figura 5.40), todos produzidos por Proteobactérias, são oriundos da rota de biossíntese mista PKS-NRPS. Nos três casos, o módulo da NRPS (*epoB*, *clbK* e *antB*, respectivamente) responsável por adicionar o resíduo de cisteína ao esqueleto do composto, apresenta um domínio C_γ que catalisa as reações de condensação e ciclização, assim como um domínio de oxidoredução, que catalisa a oxidação do anel tiazoline em tiazol (O'CONNOR; CHEN; WALSH, 2002; TAUTZ et al., 2016; XUE et al., 2019). Logo, apesar de incomum em peptídeos não-ribossomais, a arquitetura de domínios e os dados de RMN apresentados corroboram com a presença de um sistema L-Pro-thz na pseudovibriamida A (1).

Figura 5.40 – PNs que contém o heterociclo tiazol em seu esqueleto e que tiveram seu BGC estudado.

Fonte: Autoria própria.

5.10 Determinação estrutural da pseudovibriamida A2

O composto presente nas frações F2B67D1 (2,7 mg) e FD2B3D1 (2,0 mg) foi obtido como um sólido amorfo branco, com fórmula molecular C₃₆H₄₇N₁₁O₁₀S estabelecida por HRMS-ESI⁺ (Figura 5.41A) obtendo-se o íon [M + H]⁺ em *m/z* 826,3311 (calculado para 826,3306, erro de 0,6 ppm), concordando com o espectro

de HRMS-ESI⁻ (Figura 5.41B), no qual obteve-se o íon $[M - H]^-$ em m/z 824,3151 (calculado para 824,3150, erro de 0,1 ppm), e indicando 19 graus de insaturação.

Considerando-se que o composto presente nas frações F2B67D1/FD2B3D1 é biossintetizado pelo mesmo BGC da pseudovibriamida A1 (**1**), espera-se que apresentem estruturas análogas. A fórmula molecular predita ($C_{36}H_{47}N_{11}O_{10}S$), sugere que a diferença entre os dois compostos seja uma perda de água, ocasionada pela ciclização do composto **1**, como evidenciado pelo IDH calculado.

Figura 5.41 – Espectro de massas do composto presente na fração F2B67D1/FD2B3D1. A) HRMS-ESI⁺ e B) HRMS-ESI⁻.

Fonte: Autoria própria.

A análise do espectro de massas MS² do íon m/z 826,3 (Figura 5.42) evidencia alguns íons fragmentos (Tabela 5.6) iguais aos observados para a pseudovibriamida A1 (y_2' , y_3 , y_4 e y_5), assim como os respectivos pares (ausente, b_4 , b_3 e b_2) com a perda de água, indicando que a ciclização deve estar entre os três primeiros aminoácidos, Tyr-CO-Dhb-Ala.

Outra diferença significativa entre os dois espectros MS² é a ausência das quebras na conexão ureia (y_6 e y_6' , Tabela 5.4). Análises complementares do espectro de massas MS² do íon m/z 826,3 (Figura 5.42), revelaram a sequência de íons oriunda da quebra das ligações entre a carbonila da amida e o C $_{\alpha}$ dos aminoácidos (a_n , Tabela

5.6), das quais a quebra a_2 aponta que o ciclo deve estar entre os resíduos de Tyr e Dhb.

Figura 5.42 – Espectro de massas obtido por UPLC-QTOF-MS² para o composto presente na amostra F2B67D1/FD2B3D1 (m/z 826,3).

Fonte: Autoria própria.

Tabela 5.6 – Íons fragmentos identificados em análise por UPLC-QTOF-MS² para o composto presente na amostra F2B67D1/FD2B3D1 (m/z 826,3).

		<i>m/z</i> acurada	<i>m/z</i> exata	Erro (ppm)
<i>b</i>₂	C ₁₄ H ₁₃ N ₂ O ₄ ⁺	273,0883	273,0875	2,9
<i>b</i>₃	C ₁₇ H ₁₈ N ₃ O ₅ ⁺	344,1255	344,1246	2,6
<i>b</i>₄	C ₂₃ H ₃₀ N ₇ O ₆ ⁺	500,2276	500,2258	3,6
<i>y</i>₂'	C ₉ H ₁₂ N ₃ O ₄ S ⁺	258,0555	258,0549	2,3
<i>y</i>₃	C ₁₃ H ₁₉ N ₄ O ₄ S ⁺	327,1135	327,1127	2,4
<i>y</i>₄	C ₁₉ H ₃₁ N ₈ O ₅ S ⁺	483,2134	483,2138	-0,8
<i>y</i>₅	C ₂₂ H ₃₆ N ₉ O ₆ S ⁺	554,2501	554,2509	-1,4
<i>a</i>₂	C ₁₃ H ₁₃ N ₂ O ₃ ⁺	245,0927	245,0926	0,4
<i>a</i>₃	C ₁₆ H ₁₈ N ₃ O ₄ ⁺	316,1306	316,1297	2,8
<i>a</i>₄	C ₂₂ H ₃₀ N ₇ O ₅ ⁺	472,2324	472,2308	3,4
<i>a</i>₆	C ₃₀ H ₄₀ N ₉ O ₆ S ⁺	654,2847	654,2822	3,8

Fonte: Autoria própria.

A análise dos espectros de RMN de ¹H (Figura S17, 600 MHz, e S4 900 MHz), ¹³C (Figura S18) e HSQC (¹J ¹H-¹³C, Figura S19) indicaram a presença de cinco sinais correspondentes a hidrogênios ligados a C_α de aminoácidos em δ_H 3,95 (δ_C 53,59), δ_H 4,29 (δ_C 48,45), δ_H 4,41 (δ_C 57,88), δ_H 4,48 (δ_C 50,66), e δ_H 5,29 (δ_C 57,78), além do CH do heterociclo tiazol em δ_H 8,10 (δ_C 122,86) e sinais para o anel aromático *para*-

Tabela 5.7 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da amostra F2B67D1/FDB3D1 em $\text{DMSO}-d_6$ (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz, $^1\text{H}^*$: 900 MHz).

Resíduo	Posição	δ_{C} (tipo)	δ_{H} (J em Hz)	δ_{H}^* (J em Hz)
L-Tyr	NH		8,44	8,50
	CO	154,64 (CO)		
	α	57,8 (CH)	4,41 (t, 4,6)	4,41 (t, 4,6)
	β	35,2 (CH ₂)	2,90	2,89
	aromático	1: 124,75 (C)		
		2,2': 131,00 (CH)	6,95 (d, 7,6)	6,94 (d, 7,9)
		3,3': 114,9 (CH)	6,63 (d, (7,6)	6,63 (d, 7,8)
		4: 156,41 (COH)		
Dhb		172,47 (CO)		
	CO	161,87 (CO)		
	α	126,04 (C)		
	β	135,5 (CH)	6,68 (d, 6,7)	6,68 (q, 6,7)
	γ	12,62 (CH ₃)	0,94 (d, 6,7)	0,93 (d, 6,7)
L-Ala	NH		8,09	8,14 (d, 6,9)
	CO	172,07 (CO)		
	α	48,45 (CH)	4,29 (q, 7,1)	4,29 (qui, 6,9)
	β	17,88 (CH ₃)	1,19 (d, 7,1)	1,19 (d, 6,9)
L-Arg	NH		7,84	7,84 (d, 7,9)
	CO	169,30 (CO)		
	α	50,6 (CH)	4,48 (bs)	4,48 (bs)
	β	28,3 (CH ₂)	1,53 (m)	1,52 (m)
	γ	25,5 (CH ₂)	1,42 (m); 1,57 (m)	1,40 (m); 1,57 (m)
	δ	40,40 (CH ₂)	3,11 (m)	3,10 (m)
		157,22 (C)		
	guanidina		6,65	6,65 (s)
L-Pro-thz			7,31	7,33 (s)
	α	57,78 (CH)	5,29 (dd, 7,8 e 3,7)	5,29 (dd, 7,9 e 3,8)
	β	32,83 (CH ₂)	1,86 (m); 2,27 (m)	1,85 (m); 2,27 (m)
	γ	23,89 (CH ₂)	1,98 (m)	1,97 (m)
	δ	46,71 (CH ₂)	3,75 (bs)	3,75 (bq, 7,9)
	CO	159,48 (CO)		
	α'	148,98 (C)		
	β'	122,86 (CH)	8,10 (s)	8,10 (s)
L-Gln	δ'	171,81 (C)		
	NH		8,38 (d, 6,1)	8,38 (d, 6,0)
	CO	174,9 (CO)		
	α	53,59 (CH)	3,95 (q, 5,0)	3,92 (q, 6,0)
	β	29,07 (CH ₂)	1,83 (m); 2,00 (m)	1,82 (m); 1,97 (m)
	δ	31,70 (CH ₂)	2,02 (m); 2,11 (m)	1,99 (m); 2,10 (m)
	CONH ₂	174,24 (CO)	7,15	

Fonte: Autoria própria.

A presença do heterociclo imidazilidínio-diona é pouco observada na literatura de PNs, sendo exclusiva de alcaloides (Figura 5.44). A maioria destes alcaloides foi isolada de invertebrados marinhos, como esponjas marinhas, ascídias e anêmonas. Apenas dois compostos foram produzidos por microrganismos (hidantocidina e 5-[(6-bromo-1*H*-indol-3-il)metilene]-2,4-imidazolidinedione). Assim, a pseudovibriamida A2 (2) é o primeiro peptídeo não-ribossomal a apresentar este motivo estrutural em seu esqueleto.

Figura 5.44 – Compostos representativos encontrados em levantamento bibliográfico de PNs que contém heterociclo imidazilidínio-diona, destacado em vermelho.

Fonte: Autoria própria.

5.11 Determinação estrutural da pseudovibriamida A3

O composto presente na fração FD2B3A1 (1,0 mg) apresentou um íon $[M + H]^+$ em m/z 830,3267 (calculado para 830,3255, erro de 1,4 ppm), em análises por HRMS-ESI⁺ (Figura 5.45A), sugerindo a fórmula molecular $C_{35}H_{47}N_{11}O_{11}S$, a qual concorda com o íon $[M - H]^-$ em m/z 828,3093 (calculado para 828,3099, erro de -0,7 ppm) observado no espectro de HRMS-ESI⁻ (Figura 5.45B). A fórmula molecular indica 18 graus de insaturação, o mesmo da pseudovibriamida A (**1**) e a perda de uma metila (- $\Delta 14$) quando comparado com **1**.

Figura 5.45 – Espectro de massas do composto presente na fração FD2B3A1. A) HRMS-ESI⁺ e B) HRMS-ESI⁻.

Fonte: Autoria própria.

Análises do espectro de massas MS² do íon m/z 826,3 (Figura 5.46) mostraram alguns íons fragmentos (Tabela 5.8) iguais aos observados para a pseudovibriamida A1 (y_2' , y_3 , y_4 , b_2 e z_4), assim como os respectivos pares (ausente, b_4 , b_3 , y_5 , ausente, z_5), com a perda de metila, indicando que essa perda estaria no terceiro aminoácido, sugerindo a presença de um resíduo de glicina (Gly) ao invés de Ala. Esta hipótese foi confirmada pela análise detalhada do espectro de MS² desta amostra (Tabela 5.8).

Figura 5.46 – Espectro de massas obtido por UPLC-QTOF-MS² para o composto presente na amostra FD2B3A1 (m/z 830,3).

Fonte: Autoria própria.

Tabela 5.8 – Íons fragmentos identificados em análise por UPLC-QTOF-MS² para o composto presente na amostra FD2B3A1 (m/z 830,3).

		<i>m/z</i> acurada	<i>m/z</i> exata	Erro (ppm)
<i>b</i>₂	C ₁₄ H ₁₅ N ₂ O ₅ ⁺	291,0987	291,0981	2,1
<i>b</i>₃	C ₁₆ H ₁₈ N ₃ O ₆ ⁺	348,1203	348,1196	2,0
<i>b</i>₄	C ₂₂ H ₃₀ N ₇ O ₇ ⁺	504,2211	504,2207	1,0
<i>y</i>₂'	C ₉ H ₁₂ N ₃ O ₄ S ⁺	258,0552	258,0549	1,2
<i>y</i>₃	C ₁₃ H ₁₉ N ₄ O ₄ S ⁺	327,1126	327,1127	-0,3
<i>y</i>₄	C ₁₉ H ₃₁ N ₈ O ₅ S ⁺	483,2161	483,2138	4,8
<i>y</i>₅	C ₂₁ H ₃₄ N ₉ O ₆ S ⁺	540,2338	540,2353	-2,8
<i>y</i>₆	C ₂₅ H ₃₉ N ₁₀ O ₇ S ⁺	623,2738	623,2724	2,2
<i>y</i>₆'	C ₂₆ H ₃₇ N ₁₀ O ₈ S ⁺	649,2517	649,2531	2,2
<i>z</i>₄	C ₁₉ H ₂₈ N ₇ O ₅ S ⁺	466,1867	466,1873	-1,3
<i>z</i>₅	C ₂₁ H ₂₉ N ₈ O ₆ S ⁺	521,1940	521,1931	1,7

Fonte: Autoria própria.

Análise de Marfey avançada confirmou a presença de L-Tyr, L-Arg, L-Pro, L-Glu e Gly (Figuras S28-32). Assim, o heptapeptídeo presente na fração FD2B3A1 possui a sequência Tyr-CO-Dhb-Gly-Arg-Pro-thz-Gln e foi nomeado pseudovibriamida A3 (3).

5.12 Determinação estrutural da pseudovibriamida A4

O composto presente na fração FD2B3C1 (0,2 mg) apresentou um íon $[M + H]^+$ em m/z 812,3145 (calculado para 812,3150, erro de -0,6 ppm), em análises por HRMS-ESI⁺ (Figura 5.47A), sugerindo a fórmula molecular C₃₅H₄₅N₁₁O₁₀S, a qual concorda com o íon $[M - H]^-$ em m/z 810,2991 (calculado para 810,2993, erro de -0,2 ppm) observado no espectro de HRMS-ESI⁻ (Figura 5.47B). A fórmula molecular indica 19 graus de insaturação, pela perda de uma molécula de água (-Δ18) quando comparado com **3**, e de uma metila (-Δ14) quando comparado com **2**.

Figura 5.47 – Espectro de massas do composto presente na fração FD2B3C1. A) HRMS-ESI⁺ e B) HRMS-ESI⁻.

Fonte: Autoria própria.

Análises do espectro de massas MS² do íon m/z 812,3 (Figura 5.48) mostraram alguns íons fragmentos (Tabela 5.9) iguais aos observados para a pseudovibriamida A2 (y_2' , y_3 , y_4 , b_2 e z_4), assim como os respectivos pares dada a perda de metila (ausente, b_4 , b_3 , y_5 , ausente) indicando que essa perda estaria no terceiro aminoácido, sugerindo a presença de uma Gly ao invés de Ala. Análise avançada de Marfey confirmou a presença dos aminoácidos L-Tyr, L-Arg, L-Pro, L-Glu e Gly (Figuras S28, S33-36). Este composto foi nomeado pseudovibriamida A4 (4).

Figura 5.48 – Espectro de massas obtido por UPLC-QTOF-MS² para o composto presente na amostra FD2B3C1 (m/z 812,3).

Fonte: Autoria própria.

Tabela 5.9 – Íons fragmentos identificados em análise por UPLC-QTOF-MS² para o composto presente na amostra FD2B3C1 (m/z 812,3).

		<i>m/z</i> acurada	<i>m/z</i> exata	Erro (ppm)
<i>b</i>₂	C ₁₄ H ₁₃ N ₂ O ₄ ⁺	273,0877	273,0875	0,7
<i>b</i>₃	C ₁₇ H ₁₈ N ₃ O ₅ ⁺	330,1092	330,1090	0,6
<i>b</i>₄	C ₂₃ H ₃₀ N ₇ O ₆ ⁺	486,2105	486,2101	0,8
<i>y</i>₂'	C ₉ H ₁₂ N ₃ O ₄ S ⁺	258,0550	258,0549	0,4
<i>y</i>₃	C ₁₃ H ₁₉ N ₄ O ₄ S ⁺	327,1127	327,1127	0,0
<i>y</i>₄	C ₁₉ H ₃₁ N ₈ O ₅ S ⁺	483,2116	483,2138	-4,6
<i>y</i>₅	C ₂₂ H ₃₆ N ₉ O ₆ S ⁺	540,2369	540,2353	3,0
<i>a</i>₂	C ₁₃ H ₁₃ N ₂ O ₃ ⁺	245,0926	245,0926	0,0
<i>a</i>₃	C ₁₆ H ₁₈ N ₃ O ₄ ⁺	302,1146	302,1141	1,7
<i>a</i>₄	C ₂₂ H ₃₀ N ₇ O ₅ ⁺	458,2151	458,2152	-0,2
<i>a</i>₆	C ₃₀ H ₄₀ N ₉ O ₆ S ⁺	640,2667	640,2666	0,2

Fonte: Autoria própria.

5.13 Determinação estrutural das pseudovibriamidas A5-6

A fração FD2B2A (0,5 mg) apresentou dois picos cromatográficos (Figura 5.49A) com íon $[M + H]^+$ em m/z 858,35, em análises por HRMS-ESI⁺, e íon $[M - H]^-$ em m/z 856,34 em HRMS-ESI⁻, sugerindo a presença de dois isômeros. Como a diferença entre estes compostos e a pseudovibriamida A (**1**) é a adição de uma metila (+ $\Delta 14$), assim como a ausência de um gene que codifique para uma metiltransferase no *ppp* BGC, acredita-se que estes sejam artefatos de isolamento. Todavia, essa hipótese necessita ser confirmada.

Análises dos espectros de massas MS² (Tabela 5.10) do composto em t_r 4,7 (Figura 5.49B) indicaram todos os íons fragmento da série $y_{6'-2'}$ com a adição de uma metila (+ $\Delta 14$), sugerindo que a metilação ocorreu no resíduo de Gln (**5**), enquanto que o espectro de massas MS² do composto em t_r 4,8 min (Figura 5.49C) indicou todos os íons fragmento da série $y_{6'-2'}$ iguais a pseudovibriamida A (**1**), sugerindo a metilação no resíduo de Tyr (**6**). A estas estruturas deu-se o nome de pseudovibriamida A5 e A6, respectivamente.

Figura 5.49 – Dados obtidos por UPLC-QTOF-MS² para a fração FD2B2A (m/z 858,3), cromatograma (A) e espectro de massas em t_r 4,7 (B) e t_r 4,8 (C).

Fonte: Autoria própria.

Tabela 5.10 – Íons fragmentos selecionados observados em análises por UPLC-QTOF-MS² da amostra FD2B2A (m/z 858,3).

t_r (min)			m/z acurada	m/z exata	Erro (ppm)
4,7	$[M + H]^+$	$C_{37}H_{52}N_{11}O_{11}S^+$	858,3575	858,3568	0,8
	$[M - H]^-$	$C_{37}H_{50}N_{11}O_{11}S^-$	856,3398	856,3412	-1,6
	$y_2'-NH_3$	$C_{10}H_{11}N_2O_9S^+$	255,0441	155,0440	0,4
4,8	$[M + H]^+$	$C_{37}H_{52}N_{11}O_{11}S^+$	858,3578	858,3568	1,1
	$[M - H]^-$	$C_{37}H_{50}N_{11}O_{11}S^-$	856,3400	856,3412	-1,4
	$b_1'-COCH_3$	$C_8H_{10}NO^+$	136,0762	136,0762	0,0

Fonte: Autoria própria.

5.14 Determinação da estrutural da pseudovibriamida B1

O composto presente na fração C23C1B (5,9 mg) apresentou um íon $[M + H]^+$ em m/z 1156,5106 (calculado para 1156,5097, erro de -0,8 ppm) e íon $[M + 2H]^{++}$ em m/z 578,7629 (calculado para 578,7582, erro de 8,1), em análises por HRMS-ESI⁺ (Figura 5.50A), sugerindo a fórmula molecular $C_{51}H_{73}N_{13}O_{16}S$, a qual concorda com o íon $[M - H]^-$ em m/z 1154,4949 (calculado para 1154,4941, erro de 0,7 ppm) observado no espectro de HRMS-ESI⁻ (Figura 5.50B). A fórmula molecular indica 22 graus de insaturação.

Figura 5.50 – Espectro de massas do composto presente na fração C23C1B. A) HRMS-ESI⁺ e B) HRMS-ESI⁻.

Fonte: Autoria própria.

A análise dos espectros de RMN de 1H (Figura S37, 600 MHz) e ^{13}C (Figura S38) indicou a degradação do composto presente na fração C23C1B durante a aquisição dos dados. Análise posterior por UPLC-QTOF-MS (Figura 5.51) mostrou que o produto de degradação apresenta um íon $[M + H]^+$ em m/z 950,4446 (calculado para 950,4406, erro de 4,2 ppm) e $[M - H]^-$ em m/z 948,4243 (calculado para 948,4249, erro de -0,6 ppm) em análises por HRMS-ESI⁻, sugerindo a fórmula molecular $C_{41}H_{64}N_{11}O_{13}S$.

Figura 5.51 – Espectro de massas do composto presente na fração C23C1B. A) HRMS-ESI⁺ e B) HRMS-ESI⁻.

Fonte: Autoria própria.

Uma vez que o composto presente na fração C23C1B compartilha parte do esqueleto peptídico da pseudovibriamida A1 (**1**) (Figura 5.13), a amostra F2B67D2 foi novamente analisada por UPLC-QTOF-MS e o mesmo processo de degradação foi observado, levando à formação do produto com m/z 638,2740 $[M + H]^+$ (m/z 636,2566 $[M + H]^-$, Figura 5.52A-B). Análise dos espectros de massas MS² (Figura 5.52C e Figura 5.53A) mostrou a série de íons fragmento y_5 à y_2' (Tabela 5.11), sugerindo que ocorreu a quebra da ligação entre NH_{Dhb} e C α' -Dhb.

O íon fragmento y_5 de m/z 554,25 (C₂₂H₃₆N₉O₆S⁺) sugere que a pseudovibriamida A1 (**1**) sofre decomposição via hidrólise (Figura 5.53B). Neste processo ocorre a adição de água ao C α' -Dhb, resultando na perda de Tyr e formação de um enol. Acredita-se que o produto de m/z 638,27 deve estabilizar em sua forma tautomérica de dicetona como mostrado na Figura 5.53C.

Figura 5.52 – Espectro de massas do produto de degradação da pseudovibriamida A1: A) HRMS-ESI⁺, B) HRMS-ESI⁻ e C) MS²; e MS² do composto presente na amostra C23C1B com m/z 950,4 (D).

Fonte: Autoria própria.

Tabela 5.11 – Íons fragmentos identificados em análise por UPLC-QTOF-MS² para o produto de degradação da pseudovibriamida A1 (*m/z* 638.2).

		<i>m/z</i> acurada	<i>m/z</i> exata	Erro (ppm)
[M + H] ⁺	C ₂₆ H ₄₀ N ₉ O ₈ S ⁺	638,2740	638,2721	3,0
[M - NH ₃] ⁺	C ₂₆ H ₃₇ N ₈ O ₈ S ⁺	621,2459	621,2455	0,8
[M - CONH ₃] ⁺	C ₂₅ H ₃₇ N ₈ O ₇ S ⁺	593,2512	593,2506	1,0
[M - CN ₃ H ₅] ⁺	C ₂₅ H ₃₅ N ₆ O ₈ S ⁺	579,2249	579,2237	2,1
[M - H] ⁻	C ₂₆ H ₃₈ N ₉ O ₈ S ⁺	636,2568	636,2564	0,6
<i>b</i> ₄ '	C ₁₃ H ₂₂ N ₅ O ₄ ⁺	312,1683	312,1672	3,5
<i>y</i> ₂ '	C ₉ H ₁₂ N ₃ O ₄ S ⁺	258,0563	258,0549	5,4
<i>y</i> ₃	C ₁₃ H ₁₉ N ₄ O ₄ S ⁺	327,1138	327,1127	3,4
<i>y</i> ₄	C ₁₉ H ₃₁ N ₈ O ₅ S ⁺	483,2137	483,2138	-0,2
<i>y</i> ₅	C ₂₂ H ₃₆ N ₉ O ₆ S ⁺	554,2505	554,2509	-0,7

Fonte: Autoria própria.

Figura 5.53 – A) Mecanismo hipotético para a degradação das pseudovibriamidas. B) Estrutura do produto de degradação da pseudovibriamida A1 (**1**). C) Esquema de fragmentação.

Fonte: Autoria própria.

Como esperado, a análise por UPLC-QTOF-MS² do produto de degradação do composto presente na fração C23C1B (Figura 5.52D) indicou que a estrutura da

Figura 5.53B é um fragmento da degradação do composto com m/z 1156,5. Ainda que os espectros de RMN (Figura S37-42) correspondam a uma mistura de compostos que compartilham a mesma estrutura, ou seja, apresentam vários sinais sobrepostos, pôde-se identificar os resíduos de aminoácidos Tyr, Dhb, Ala, Arg, Pro-thz e Gln (Figura 5.54), posteriormente confirmados de estereoquímica L por análise avançada de Marfey (Figuras S43-47).

Figura 5.54 – Correlações nos espectros de COSY e HMBC para determinar a presença da pseudovibriamida A1 como subestrutura no composto presente na fração C23C1B.

Fonte: Autoria própria.

Ademais, pôde-se observar a presença de dois sinais correspondentes a hidrogênios ligados a C_α de aminoácidos, δ_H 4,08 (δ_C 55,26) e δ_H 4,77 (δ_C 57,12), e dois CH ligados a heteroátomo em δ_H 5,10 (δ_C 70,38) e δ_H 5,33 (δ_C 69,28). A análise dos espectros de RMN 2D de HSQC-TOCSY (Figura S39), COSY (Figura S41), e HMBC (Figura S42) permitiu a identificação do resíduo de L-Val (Figura 5.55A e S48), assim como de uma hidroxiprolina (Hyp) modificada, na qual o H_α (4,77) está conectado a um fragmento CH-CH₂-CO₂H (Figura 5.55), biossintetizado pelo módulo PKS do *pppD*. Além dessa modificação, a Hyp está ligada a um resíduo de propionato, observando-se a correlação entre CH de δ_H 5,10 (δ_C 70,4) e CO (δ_C 173,01) (Figura 5.55A).

A conectividade entre esses dois resíduos de aminoácidos foi confirmada pela correlação no espectro de RMN de HMBC entre $H_{\alpha\text{-Hyp}}$ (δ_H 4,77) e CO_{Val} (δ_C 169,26), assim como, a conectividade entre os dois fragmentos (Figura 5.55A) pela correlação entre CH em δ_H 5,33 (δ_C 69,28) e CO_{Gln} (δ_C 170,81).

Figura 5.55 – Correlações nos espectros de HQSC-TOCSY, COSY e HMBC para determinar a presença resíduo de Val e Hyp modificada no composto presente na fração C23C1B.

Fonte: Autoria própria.

A Tabela 5.12 apresenta a atribuição final dos sinais de RMN de ^1H e ^{13}C para o composto **7**, que foi nomeado pseudovibriamida B1. Nela também se inclui os deslocamentos químicos característico do produto de degradação, que apontam para a presença de uma dicetona conectada a uma cadeia $\text{CH}_2\text{-CH}_3$. Por fim, a análise do espectro de massas MS^2 (Figura 5.13B e Tabela 5.13) corrobora com a estrutura **7** proposta.

Tabela 5.12 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da amostra C23C1B em $\text{DMSO-}d_6$ (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz).

Resíduo	Posição	δ_{C} (tipo)	δ_{H} (J em Hz)
L-Tyr	CO_2H	174,04 (CO)	
	NH		6,11
	CO	155,19 (CO)	
	α	54,09 (CH)	4,25
	β	36,83 (CH_2)	2,83; 2,72
	aromático	1: 155,99 (C)	
		2; 2': 114,99 (CH)	6,66
		3; 3': 130,14 (CH)	6,95
		4: 127,58 (C)	
Dhb	NH		7,82
	CO	164,98 (CO)	
	α	131,95 (CH)	
	β	121,71 (CH)	5,94 (q; 7,1)
	γ	12,54 (CH_3)	1,59 (d; 7,1)
L-Ala	NH		8,41
	CO	171,67 (CO)	
	α	48,14 (CH)	4,33
	β	17,99 (CH_3)	1,26 (d; 7,0)
L-Arg	NH		8,25
	CO	170,27 (CO)	
	α	50,28 (CH)	4,56
	β	28,16 (CH_2)	1,59; 1,78
	γ	24,89 (CH_2)	1,56
	δ	40,37 (CH_2)	3,11
	guanidina		2,53
		156,89 (C)	
			7,35
L-Pro-thz			7,53; 7,49
	α	58,52 (CH)	5,31
	β	31,59 (CH_2)	2,27
	γ	24,01 (CH_2)	2,02; 1,97
	δ	46,80 (CH_2)	3,78; 3,74
	CO	160,62 (CO)	
	α'	149,03 (C)	
	β'	124,10 (CH)	8,16
	δ'	173,87 (C)	
L-Gln	NH		8,73
	CO	170,81 (CO)	
	α	51,93 (CH)	4,43
	β	31,14 (CH_2)	2,14
	δ	25,62 (CH_2)	2,15; 1,97
	CONH_2	173,51 (CO)	

Continua →

Continuação da Tabela 4.12

Hyp	α	57,12 (CH)	4,77
	β	70,38 (CH ₂)	5,10
	γ	29,57 (CH ₂)	2,24
	δ	44,66 (CH ₂)	3,77; 3,52
	α'	69,28 (CH)	5,33
	α''	35,72 (CH ₂)	2,47
	CO ₂ H	171,08 (CO)	
	C β O ₂	173,01 (CO)	
	β'	26,81 (CH ₂)	2,30
	β''	8,82 (CH ₃)	1,02 (t; 7,7)
L-Val	NH		8,10
	CO	169,26 (CO)	
	α	55,26 (CH)	4,08
	β	29,28 (CH ₂)	2,01
	γ	16,93 (CH ₃)	0,81
		18,28 (CH ₃)	0,89
<i>Sinais chave do produto de degradação</i>			
	CO	199,24 (CO)	
	CH ₂	30,15 (CH ₂)	2,81 (ddd; 2,4; 7,1; 15,3)
	CH ₃	7,02 (CH ₃)	0,96 (t; 7,1)

Fonte: Autoria própria.

Tabela 5.13 – Íons fragmentos identificados em análise por UPLC-QTOF-MS² para o composto presente na amostra C23C1B (*m/z* 1156,5).

		<i>m/z</i> acurada	<i>m/z</i> exata	Erro (ppm)
b₇'	C ₃₆ H ₅₀ N ₁₁ O ₈ S ⁺	844,3410	844,3412	-0,2
y₂'	C ₁₅ H ₂₅ N ₂ O ₅ ⁺	313,1786	313,1763	7,3
y₈'	C ₄₂ H ₆₃ N ₁₂ O ₁₃ S ⁺	975,4393	975,4358	3,6
y₈'-y₂'	C ₂₇ H ₃₉ N ₁₀ O ₈ S ⁺	663,2687	663,2673	2,1

Fonte: Autoria própria.

Esse mesmo fragmento está presente estrutura das rimosamidas e detoxinas (Figura 5.6), no qual o gene Rmol, uma NRPS-PKS, codifica para Val/Ile-Pro e uma unidade malonato, analogamente ao PppD. Ambos BGCs contêm uma dioxigenase dependente de Fe/ α -cetoglutarato, a qual acredita-se que seja responsável pela hidroxilação do resíduo de prolina, no entanto, os genes responsáveis pela adição da unidade de acetato a Hyp não foi identificado em nenhum dos casos.

5.15 Determinação da estrutura das pseudovibriamidas B2-3

Considerando-se a estrutura da pseudovibriamida B1 (**7**), foi possível determinar as estruturas das pseudovibriamidas B2-6 através de análises comparativas dos espectros de massas MS² e de análises pelo método de Marfey avançado.

O composto presente na fração C23C1C (6,2 mg) apresentou um íon [M + H]⁺ em m/z 1170,5229 (calculado para 1170,5254, erro de -2,1 ppm) e íon [M + 2H]⁺⁺ em m/z 585,767 (calculado para 585,7660, erro de 2,7 ppm), em análises por HRMS-ESI⁺ (Figura 5.56A), sugerindo a fórmula molecular C₅₂H₇₅N₁₃O₁₆S, a qual concorda com o íon [M - H]⁻ em m/z 1168,5101 (calculado para 1158,5097, erro de 0,3 ppm) observado no espectro de HRMS-ESI⁻ (Figura 5.56B). A fórmula molecular indica a adição de uma metila (+Δ14) quando comparado com **7**.

Figura 5.56 – Espectro de massas do composto presente na fração C23C1C. A) HRMS-ESI⁺ e B) HRMS-ESI⁻.

Fonte: Autoria própria.

Já o íon fragmento y_2' (Tabela 5.14) do espectro de massas MS² do íon m/z 1170,5 (Figura 5.13C) indica que esta metila está presente no fragmento biossintetizado pelo *pppD*. Análises pelo método de Marfey avançado (Figuras S49-51) confirmaram a presença de L-Ile e L-Leu (Figura 5.57), fazendo da fração C23C1C

uma mistura dos isômeros **8** e **9**, os quais foram nomeados pseudovibriamidas B2 e B3, respectivamente.

Tabela 5.14 – Íons fragmentos identificados em análise por UPLC-QTOF-MS² para o composto presente na amostra C23C1C (m/z 1170,5).

		<i>m/z</i> acurada	<i>m/z</i> exata	Erro (ppm)
<i>b</i>₇'	C ₃₆ H ₅₀ N ₁₁ O ₈ S ⁺	844,3412	844,3412	0,0
<i>y</i>₂'	C ₁₆ H ₂₇ N ₂ O ₅ ⁺	327,1922	327,1920	0,6
<i>y</i>₈	C ₄₂ H ₆₇ N ₁₂ O ₁₂ S ⁺	963,4732	963,4722	1,0
<i>y</i>₈'	C ₄₃ H ₆₅ N ₁₂ O ₁₃ S ⁺	989,4521	989,4515	0,6
<i>y</i>₈'-<i>y</i>₂'	C ₂₇ H ₃₅ N ₁₀ O ₈ S ⁺	663,2673	663,2673	0,0

Fonte: Autoria própria.

Figura 5.57 – Comparação dos cromatogramas obtidos em análise de UPLC-QTOF-MS da hidrólise dos compostos presentes na fração C23C1C e derivatizados com + L-FDTA (A), e padrões dos aminoácidos L-Ile + L-FDTA (B), L-*allo*-Ile + L-FDTA (C) e L-Leu + L-FDTA (D).

Fonte: Autoria própria. Condições de análises realizadas como descrito anteriormente por Freire et al. (2019).

Os demais resíduos de aminoácidos, Tyr, Dhb, Ala, Arg, Pro-thz e Gln, também foram confirmados de estereoquímica L por análise avançada de Marfey (Figuras S52-56).

5.16 Determinação da estrutural da pseudovibriamida B4

O composto presente na fração C23C1A (2,7 mg) apresentou um íon $[M + H]^+$ em m/z 1142,4929 (calculado para 1142,4941, erro de -1,1 ppm) e íon $[M + 2H]^{++}$ em m/z 571,7513 (calculado para 571,7504, erro de 1,5 ppm), em análises por HRMS-ESI⁺ (Figura 5.58A), sugerindo a fórmula molecular $C_{50}H_{71}N_{13}O_{16}S$, a qual concorda com o íon $[M - H]^-$ em m/z 1140,4781 (calculado para 1140,4684, erro de -0,3 ppm) observado no espectro de HRMS-ESI⁻ (Figura 5.58B). A fórmula molecular indica a perda de uma metila ($-\Delta 14$) quando comparado com a pseudovibriamida B1 (**7**).

Análises do espectro de massas MS² do íon m/z 1142,5 (Figura 5.58C) mostrou o íon fragmento y_2' (Tabela 5.15) igual ao observado para a pseudovibriamida A3 (**3**), e o respectivo par (b_7') com a perda de metila. Por sua vez, o íon b_7' corresponde ao íon $[M + H]^+$ da pseudovibriamida A3 (**3**), assim como o íon $y_8'-y_2'$ é igual ao íon y_6 de **3**, sugerindo a presença de um resíduo de Gly ao invés de Ala, quando comparado a **7**. A presença de Gly, assim como dos demais aminoácidos foi confirmada por análise de Marfey avançado (Figuras S57-62). O composto foi nomeado pseudovibriamida B4 (**10**).

Figura 5.58 – Espectro de massas do composto presente na fração C23C1A. A) HRMS-ESI⁺ e B) HRMS-ESI⁻ e C) MS² (m/z 1142,5).

Fonte: Autoria própria.

Tabela 5.15 – Íons fragmentos identificados em análise por UPLC-QTOF-MS² para o composto presente na amostra C23C1A (*m/z* 1140,5).

		<i>m/z</i> acurada	<i>m/z</i> exata	Erro (ppm)
<i>b</i>₇'	C ₃₆ H ₅₀ N ₁₁ O ₈ S ⁺	830,3218	830,3255	-4,5
<i>y</i>₂'	C ₁₅ H ₂₅ N ₂ O ₅ ⁺	313,1763	313,1763	0,0
<i>y</i>₈'	C ₄₃ H ₆₅ N ₁₂ O ₁₃ S ⁺	961,4154	961,4202	-5,0
<i>y</i>₈'-<i>y</i>₂'	C ₂₇ H ₃₅ N ₁₀ O ₈ S ⁺	649,2501	649,2517	-2,5

Fonte: Autoria própria.

5.17 Determinação da estrutural das pseudovibriamidas B5-6

O composto presente na fração C23C1D (1,4 mg) apresentou um íon [M + H]⁺ em *m/z* 1152,5126 (calculado para 1152,5248, erro de -1,9 ppm), e íon [M + 2H]⁺⁺ em *m/z* 576,7609 (calculado para 576,7608, erro de 0,2 ppm), em análises por HRMS-ESI⁺ (Figura 5.59A), sugerindo a fórmula molecular C₅₀H₇₁N₁₃O₁₆S, a qual concorda com o íon [M - H]⁻ em *m/z* 1150,4996 (calculado para 1150,4992, erro de 0,3 ppm) observado no espectro de HRMS-ESI⁻ (Figura 5.59B). A fórmula molecular indica a perda de água (-Δ18) quando comparado com as pseudovibriamidas B2-3 (**8-9**).

Análises do espectro de massas MS² do íon *m/z* 1152,5 (Figura 5.59C) mostrou o íon fragmento *y*₂' (Tabela 5.16) igual ao observado para a pseudovibriamida B2-3 (**8-9**), e o respectivo par (*b*₇') com a perda de água. Por sua vez, o íon *b*₇' corresponde ao íon [M + H]⁺ da pseudovibriamida A2 (**2**). Como outras quebras não foram observadas, acredita-se que, assim como **2**, o composto presente na fração C23C1D apresenta uma ciclização entre os resíduos de Tyr e Dhb.

Análise avançada de Marfey confirmou a presença de L-Tyr, L-Ala, L-Arg, L-Pro e L-Glu (Figuras S63-67), e também L-Ile e L-Leu (Figuras S68-70), sugerindo a presença de dois isômeros, **11** e **12**, que foram nomeados pseudovibriamida B5-6, respectivamente.

Figura 5.59 – Espectro de massas do composto presente na fração C23C1D. A) HRMS-ESI⁺ e B) HRMS-ESI⁻ e C) MS² (m/z 1152,5).

Fonte: Autoria própria.

Tabela 5.16 – Íons selecionados identificados em análise por UPLC-QTOF-MS² da amostra C23C1D (m/z 1152,5).

		<i>m/z</i> acurada	<i>m/z</i> exata	Erro (ppm)
<i>b</i>₇'	C ₃₆ H ₄₈ N ₁₁ O ₁₀ S ⁺	826,3322	826,3306	1,9
<i>y</i>₂'	C ₁₆ H ₂₇ N ₂ O ₅ ⁺	327,1912	327,1920	-2,4

Fonte: Autoria própria.

5.18 Desenvolvimento dos mutantes *pppH*, *pppl* e *pppH*, e detecção de intermediários de biossíntese do *ppp* BGC

Considerando-se as análises por multigene blast apresentadas na sessão 5.3, acredita-se que o *ppp* BGC se estende por 37,4 kb do plasmídeo 2 de *P. brasiliensis* Ab134, contendo ao menos os genes *pppA-K*, como mostrado na Figura 5.5. Estas análises também indicaram que os genes *pppH*, *pppl* e *pppJ* codificam para proteínas de função desconhecida. Assim, para investigar a função desses genes na biossíntese das pseudovibriamidas, os mutantes *pppH*, *pppl* e *pppJ* foram construídos por deleção *in frame* (Figura 5.60). Obteve-se ao menos três réplicas biológicas para cada deleção (*pppH*: 42, 51 e 52; *pppl*: 61, 62, 15 e 22; *pppJ*: 1, 8 e 34), confirmadas por PCR diagnóstica, constatando o amplicon para os mutantes (seta vermelha) e para o WT (seta azul).

Análises MALDI-TOF DD foram utilizadas para comparar o perfil químico produzido em meio de cultura semissólida pelas linhagens *P. brasiliensis* Ab134 WT e mutantes para *pppHIJ*. Os dados estão sumarizados na Figura 5.61. Ao comparar o perfil químico do WT e dos MTs, foi possível observar que a produção das pseudovibriamidas B foi interrompida, enquanto as pseudovibriamidas A continuaram presentes nos extratos dos *pppH*, *pppl* e *pppJ*, indicando que as enzimas codificadas por esses genes estão envolvidas na biossíntese da dipeptídeo Val/Ile/Leu-Hyp-PK produzido por PppD.

Figura 5.60 – Foto do gel de agarose obtido após amplificação por PCR da região contendo *pppH* (A), *pppl* (B) e *pppJ* (C).

Fonte: Autoria própria. Os primers utilizados se ligam nas regiões adjacentes a utilizada para recombinação homóloga. Obs.: gel contendo 0,7% de agarose, 90 min. Primers: *pppH* (oLI38/P2_NRPSup_r); *pppl* (oLI33/oLI45) e *pppJ* (oLI37/oLI45).

Análises por MALDI-TOF destacam o íon de m/z 1162,7 com um intermediário putativo acumulado. Porém, dados de MS^2 não o sustentam essa hipótese, por não apresentar quebras características das pseudovibriamidas. Análises por UPLC-QTOF- MS^2 subsequentes foram realizadas com o intuito de identificar picos cromatográficos que apresentassem o mesmo perfil de fragmentação das pseudovibriamidas, no entanto nenhum íon foi identificado.

Apesar de ser evidente que PppH, Pppl e PppJ estejam envolvidos na biossíntese das pseudovibriamidas B, com os dados adquiridos até então ainda não se pode afirmar sua função e experimentos adicionais serão necessários para identificar os intermediários de biossíntese.

Figura 5.61 – Espectro de massas obtido por MALDI-TOF DD de extratos de *P. brasiliensis* Ab134 WT (B) e mutantes, *pppH* (C), *pppI* (D) e *pppJ* (E). MB (A) foi utilizado como controle negativo.

Fonte: Autoria própria. Todas as réplicas biológicas dos mutantes foram analisadas. Aqui estão representadas a replica biológica *pppH* 42, *pppI* 61 e *pppJ* 08.

5.19 Considerações sobre a biossíntese das pseudovibriamidas

As pseudovibriamidas são biossintetizadas por um NRPS-PKS BGC que contém dois domínios de TE, o que permite a produção de dois conjuntos de compostos: os heptapeptídeos pseudovibriamidas A1-6 e os depsipeptídeos pseudovibriamidas B1-6 (Figura 5.62). Esse BGC também apresenta três domínios diferentes de condensação que são responsáveis por inserir modificações nos esqueletos desses peptídeos: C_u catalisa a formação de uma ligação ureia (módulo 2), C_D catalisa a formação da ligação peptídica e a desidratação do resíduo de Thr, levando a formação de resíduo de Dhb (módulo 3), e a combinação de C_y e o domínio de oxireductase origina o heterociclo tiazol (módulo 6). Apesar do *motif* de C_y já ter sido identificado na literatura (DOWLING et al., 2016), o presente trabalho mostrou indícios para a caracterização do *motif* para C_u, e experimentos futuros devem estudar a hipótese apresentada na sessão 5.9.

Já as pseudovibriamidas B possuem um resíduo de hidroxiprolina modificado, em decorrência da presença do módulo de PKS no PppD. A estrutura das pseudovibriamidas B (7-12) é remanescente a das rimosamidas, produzidas por *Streptomyces* spp. (Figura 5.6). Acredita-se que a formação da ligação éster desses depsipeptídeos, seja oriunda da reação entre o grupo álcool do dipeptídeo biossintetizado por PppD, e o tioéster do heptapeptídeo biossintetizado por PppABC. Ambos BGCs possuem genes codificantes para dioxigenase dependente de Fe/α-cetoglutarato, a qual acredita-se ser responsável pela hidroxilação do resíduo de Pro. No entanto, ambas hipóteses ainda carecem de comprovação.

Outra característica única das pseudovibriamidas A2 (2), A4 (4) e B5-6 (11-12) é a presença de um anel imidazolidinil-diona. Embora esse heterociclo seja encontrado em alcaloides obtidos a partir de invertebrados marinhos, as pseudovibriamidas constituem a primeira classe de peptídeos bacterianos a apresentar esse heterociclo. O mecanismo enzimático responsável pela formação desse anel ainda é desconhecido.

Por fim, apesar do mutante *pppD* acumular a pseudovibriamida A1 (1), indicando que ocorre liberação do produto de biossíntese de *pppABC*, a quantidade detectada é bem menor quando comparada com a observada para a linhagem WT (Figura 5.12). Desse modo, duas rotas são consideradas, onde as pseudovibriamidas

A são produto da liberação pelo TE-PppC (Figura 5.62a) ou são produto da hidrólise das pseudovibriamidas B (Figura 5.62b).

Figura 5.62 – Organização do *ppp* BGC e mecanismo hipotético para a produção das pseudovibriamidas.

Fonte: Autoria própria.

6 CONCLUSÃO

O sequenciamento do genoma de *P. brasiliensis* Ab134 mostrou que essa linhagem possui um cromossomo e 5 plasmídeos. Dentre os BGCs identificados no genoma de *P. brasiliensis* Ab134, um NRPS-PKS BGC, aqui nomeado *ppp*, é amplamente conservado em linhagens de *Pseudovibrio* spp., e em algumas linhagens de *Pseudomonas* spp., o que sugeriu que os produtos desse BGC desempenhassem um importante papel ecológico. Assim como em *P. brasiliensis* Ab134, o *ppp* BGC também parece estar presente em plasmídeos de outras cepas de *Pseudovibrio* spp., devido à presença de uma origem de replicação no mesmo *contig* (dados não mostrados), o que facilitaria a sua transferência horizontal e pode explicar a sua ampla distribuição no gênero. Por outro lado, o *ppp* BGC está localizado no cromossomo das linhagens de *Pseudomonas*, próximo aos genes que codificam lipopeptídeos (dados não mostrados), compostos conhecidos por influenciar na motilidade dessas bactérias. A co-localização desses dois BGCs pode facilitar a sua co-regulação, quando envolvidos nos mesmos fenótipos.

O desenvolvimento da metodologia de inativação de genes via recombinação homóloga para *P. brasiliensis* Ab134 levou à descoberta das pseudovibriamidas, e o seu papel perante os fenótipos de *swarm* e formação de biofilme. Os bioensaios de motilidade mostraram que o mutante *pppA*, o qual não produz nenhuma das pseudovibriamidas, tem sua habilidade de *swarm* reduzida e formação de biofilme aumentada, enquanto que o mutante *pppD*, produtores apenas das pseudovibriamidas A, mantiveram sua habilidade de *swarm*, porém a formação de biofilme foi reduzida, indicando que estes compostos estão envolvidos nesses fenótipos. Experimentos de complementação química utilizando-se a pseudovibriamida A1 (dados não mostrados), não restaurou o *swarming* de *pppA*. Apesar da evidente influência das pseudovibriamidas para com a motilidade de *P. brasiliensis* Ab134, os mecanismos que mediam essa interação permanecem desconhecidos e estudos adicionais devem ser conduzidos para explicá-los.

O isolamento das pseudovibriamidas foi um grande desafio, levando-se em conta o baixo rendimento da produção desses peptídeos em condições padrão de cultivo em laboratório, por estarem majoritariamente localizadas dentro das células e por serem compostos polares instáveis. A avaliação de diferentes metodologias para

o cultivo e extração foi essencial para a obtenção de quantidades suficientes dos compostos para aquisição dos dados de ressonância magnética nuclear. A expressão do *ppp* BGC é mais significativa em meio de cultura semissólido, mais especificamente em condições que favorecem o fenótipo de *swarming*. Além disso, a recuperação apenas das células, se mostrou uma estratégia eficaz para obter-se as pseudovibriamidas B.

A determinação estrutural das pseudovibriamidas revelou três modificações inseridas por domínios condensação incomuns: uma conexão via um resíduo de ureia, a presença de um resíduo de ácido desidroaminobutírico, e um anel tiazol. Análises de filogenia subsequentes apontaram para um possível motivo enzimático responsável pela formação da ligação ureia ao invés de uma ligação peptídica. No caso das pseudovibriamidas B, o mecanismo responsável pela formação da ligação éster entre o heptapeptídeo biossintetizado por *pppABC* e o dipeptídeo por *pppD*, também é curioso por desviar da linha de biossíntese canônica das NRPS. Ainda, a presença de um anel imidazolidinil-diona em algumas das pseudovibriamidas (A2, A4 e B5-6) é outra característica única desses compostos.

Além de serem um objeto de estudo promissor do ponto de vista ecológico, podendo ampliar o conhecimento quanto aos produtos naturais possivelmente envolvidos nas interações entre micro- e macrorganismos, as pseudovibriamidas se mostraram relevantes também do ponto de vista biossintético, por apresentarem características estruturais incomuns em peptídeos não-ribossomais bacterianos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACS-SOLUTION, C. A. S. **SciFinder**. Disponível em: <https://scifinder.cas.org>.

ALEX, A.; ANTUNES, A. Whole genome sequencing of the symbiont *Pseudovibrio* sp. from the intertidal marine sponge polymastia penicillus revealed a gene repertoire for host-switching permissive lifestyle. **Genome Biology and Evolution**, v. 7, n. 11, p. 3022–3032, 2015.

ALEX, A.; ANTUNES, A.. Genus-wide comparison of *Pseudovibrio* bacterial genomes reveal diverse adaptations to different marine invertebrate hosts. **PLoS ONE**, v. 13, n. 5, p. e0194368, 2018.

ALEX, A.; SILVA, V.; VASCONCELOS, V.; ANTUNES, A. Evidence of unique and generalist microbes in distantly related sympatric intertidal marine sponges. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. e80653, 2013.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990.

ARRAULT, A.; WITCZAK-LEGRAND, A.; GONZALEZ, P.; BONTEMPS-SUBIELOS, N.; BANAIGS, B. Structure and total synthesis of cyclodidemnamide B, a cycloheptapeptide from the ascidian *Didemnum molle*. **Tetrahedron Letters**, v. 43, n. 22, p. 4041–4044, 2002.

BALIBAR, C. J.; VAILLANCOURT, F. H.; WALSH, C. T. Generation of D amino acid residues in assembly of arthrofactin by dual condensation/epimerization domains. **Chemistry & Biology**, v. 12, n. 11, p. 1189–1200, 2005.

BERGEIJK, D. A. VAN; TERLOUW, B. R.; MEDEMA, M. H.; WEZEL, G. P. VAN. Ecology and genomics of Actinobacteria: new concepts for natural product discovery. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, p. 546–558, 2020.

BERMAN, H. M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHAT, T. N.; WEISSIG, H.; SHINDYALOV, I. N.; BOURNE, P. E. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235–242, 2000.

BLIN, K.; SHAW, S.; STEINKE, K.; VILLEBRO, R.; ZIEMERT, N.; LEE, S. Y.; MEDEMA, M. H.; WEBER, T. antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. W1, p. 81–87, 2019.

BONDAREV, V.; RICHTER, M.; ROMANO, S.; PIEL, J.; SCHWEDT, A.; SCHULZ-VOGT, H. N. The genus *Pseudovibrio* contains metabolically versatile bacteria adapted for symbiosis. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 7, p. 2095–2113, 2013.

CABOCHE, S.; PUPIN, M.; LECLÈRE, V.; FONTAINE, A.; JACQUES, P.; KUCHEROV, G. NORINE: a database of nonribosomal peptides. **Nucleic Acids Research**, v. 36, p. 326–331, 2008.

CANTÚ, M. D.; CARRILHO, E.; WULFF, N. A.; PALMA, M. S. Seqüenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 669–675, 2008.

CARNEY, J. R.; RINEHART, K. L. Biosynthesis of brominated tyrosine metabolites by *Aplysina fistularis*. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 7, p. 971–985, 1995.

- CASTRO, M. V.; IÓCA, L. P.; WILLIAMS, D. E.; COSTA, B. Z.; MIZUNO, C. M.; SANTOS, M. F. C.; JESUS, K.; FERREIRA, E. L. F.; SELEGHIM, M. H. R.; SETTE, L. D.; PEREIRA-FO, E. R.; FERREIRA, A. G.; GONÇALVES, N. S.; SANTOS, R. A.; ANDERSEN, R. J.; BERLINCK, R. G. S. Condensation of macrocyclic polyketides produced by *Penicillium* sp. DRF2 with mercaptopyruvate represents a new fungal detoxification pathway. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 6, p. 1668–1678, 2016.
- CHALLIS, G. L.; RAVEL, J.; TOWNSEND, C. A. Predictive, structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. **Chemistry & Biology**, v. 7, n. 3, p. 211–224, 2000.
- CHOUDHARY, A.; NAUGHTON, L. M.; DOBSON, A. D. W.; RAI, D. K. High-performance liquid chromatography/electrospray ionisation mass spectrometric characterisation of metabolites produced by *Pseudovibrio* sp. W64, a marine sponge derived bacterium isolated from Irish waters. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 32, n. 19, p. 1737–1745, 2018.
- CHRISTIANSEN, G.; FASTNER, J.; ERHARD, M.; BÖRNER, T.; DITTMANN, E. Microcystin biosynthesis in *Planktothrix*: genes, evolution, and manipulation. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 2, p. 564–572, 2003.
- CHU, C.; MURDOCK, M. H.; JING, D.; WON, T. H.; CHUNG, H.; KRESSEL, A. M.; TSAAVA, T.; ADDORISIO, M. E.; PUTZEL, G. G.; ZHOU, L.; BESSMAN, N. J.; YANG, R.; MORIYAMA, S.; PARKHURST, C. N.; LI, A.; MEYER, H. C.; TENG, F.; CHAVAN, S. S.; TRACEY, K. J.; RAGEV, A.; SCHROEDER, F. C.; LEE, F. C.; LISTON, C.; ARTIS, D. The microbiota regulate neuronal function and fear extinction learning. **Nature**, v. 574, n. 7779, p. 543–548, 2019.
- CRAWFORD, J. M.; CLARDY, J. Bacterial symbionts and natural products. **Chemical Communications**, v. 47, n. 27, p. 7559–7566, 2011.
- CROWLEY, S. P.; O'GARA, F.; O'SULLIVAN, O.; COTTER, P. D.; DOBSON, A. D. W. Marine *Pseudovibrio* sp. as a novel source of antimicrobials. **Marine drugs**, v. 12, n. 12, p. 5916–5929, 2014.
- DARLING, A. C. E.; MAU, B.; BLATTNER, F. R.; PERNA, N. T. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. **Genome Research**, v. 14, n. 7, p. 1394–1403, 2004.
- DELCHER, A. L.; BRATKE, K. A.; POWERS, E. C.; SALZBERG, S. L. Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer. **Bioinformatics**, v. 23, n. 6, p. 673–679, 2007.
- DOSE, B.; NIEHS, S. P.; SCHERLACH, K.; FLÓREZ, L. V.; KALTENPOTH, M.; HERTWECK, C. Unexpected bacterial origin of the antibiotic icosalide: two-tailed depsipeptide assembly in multifarious *Burkholderia* symbionts. **ACS Chemical Biology**, v. 13, n. 9, p. 2414–2420, 2018.
- DOWLING, D. P.; KUNG, Y.; CROFT, A. K.; TAGHIZADEH, K.; KELLY, W. L.; WALSH, C. T.; DRENNAN, C. L. Structural elements of an NRPS cyclization domain and its intermodule docking domain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 44, p. 12432–12437, 2016.
- DUAN, Y.; PETZOLD, M.; SALEEM-BATCHA, R.; TEUFEL, R. Bacterial tropone natural products and derivatives: overview of their biosynthesis, bioactivities,

ecological role and biotechnological potential. **ChemBioChem**, p. 1–25, 2020.

DZIEWIT, L.; CZARNECKI, J.; PROCHWICZ, E.; WIBBERG, D.; SCHLÜTER, A.; PÜHLER, A.; BARTOSIK, D. Genome-guided insight into the methylotrophy of *Paracoccus aminophilus* JCM 7686. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 852, 2015.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1792–1797, 2004.

ENTICKNAP, J. J.; KELLY, M.; PERAUD, O.; HILL, R. T. Characterization of a culturable alphaproteobacterial symbiont common to many marine sponges and evidence for vertical transmission via sponge larvae. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 5, p. 3724–3732, 2006.

ESTEVEZ, A. I. S.; CULLEN, A.; THOMAS, T. Competitive interactions between sponge-associated bacteria. **FEMS microbiology ecology**, v. 93, n. 3, p. 1–8, 2017.

FILLOUX, A.; RAMOS, J. L. Preface. *Pseudomonas* methods and protocols. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1149, p. v, 2014.

FISCHBACH, M. A.; T. WALSH, C. Assembly-Line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms. **Chemical Reviews**, v. 106, n. 8, p. 3468–3496, 2006.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J.; SZEWZYK, U.; STEINBERG, P.; RICE, S. A.; KJELLEBERG, S. Biofilms: An emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 563–575, 2016.

FREIRE, V. F.; SLIVINSKI, J.; QUINTANA-BULLA, J. I.; MORAES, F. C.; PARADAS, W. C.; SALGADO, L. T.; PEREIRA, R. C.; MOURA, R. L.; AMADO-FILHO, G. M.; FERREIRA, A. G.; BERLINCK, R. G. S. Clathriamide, an hexapeptide isolated from the marine sponge *Clathria* (*Clathria*) *nicoleae*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, n. 6, p. 715–719, 2019.

FRÓES, A. M. *et al.* Genomic attributes of novel symbiont *Pseudovibrio brasiliensis* sp. nov. Isolated from the sponge *Arenosclera brasiliensis*. **Frontiers in Marine Science**, v. 5, p. 1–10, 2018.

FUKUNAGA, Y.; KURAHASHI, M.; TANAKA, K.; YANAGI, K.; YOKOTA, A.; HARAYAMA, S. *Pseudovibrio ascidiaceicola* sp. nov., isolated from ascidians (sea squirts). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 2, p. 343–347, 2006.

GAO, S. S.; NAOWAROJNA, N.; CHENG, R.; LIU, X.; LIU, P. Recent examples of α -ketoglutarate-dependent mononuclear non-haem iron enzymes in natural product biosyntheses. **Natural Product Reports**, v. 35, n. 8, p. 792–837, 2018.

GAUDELLI, N. M.; LONG, D. H.; TOWNSEND, C. A. β -Lactam formation by a non-ribosomal peptide synthetase during antibiotic biosynthesis. **Nature**, v. 520, n. 7547, p. 383–387, 2015.

GENG, H.; BRUHN, J. B.; NIELSEN, K. F.; GRAM, L.; BELAS, R. Genetic dissection of tropodithietic acid biosynthesis by marine *Roseobacters*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 5, p. 1535–1545, 2008.

GUO, C. J.; ALLEN, B. M.; HIAM, K. J.; DODD, D.; TREUREN, W. VAN; HIGGINBOTTOM, S.; NAGASHIMA, K.; FISCHER, C. R.; SONNENBURG, J. L.;

- SPITZER, M. H.; FISCHBACH, M. A. Depletion of microbiome-derived molecules in the host using *Clostridium* genetics. **Science**, v. 366, n. 6471, p. eaav1282, 2019.
- GUTTENPLAN, S. B.; KEARNS, D. B. Regulation of flagellar motility during biofilm formation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 6, p. 849–871, 2013.
- HARRINGTON, C.; REEN, F. J.; MOOIJ, M. J.; STEWART, F. A.; CHABOT, J. B.; GUERRA, A. F.; GLÖCKNER, F. O.; NIELSEN, K. F.; GRAM, L.; DOBSON, A. D. W.; O'GARA, F. Characterisation of non-autoinducing tropodithietic acid production from marine sponge *Pseudovibrio* species. **Marine Drugs**, v. 12, n. 12, p. 5960–5978, 2014.
- HARSHEY, R. M. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. **Annual Review of Microbiology**, v. 57, p. 249–273, 2003.
- HENTSCHEL, U.; PIEL, J.; DEGNAN, S. M.; TAYLOR, M. W. Genomic insights into the marine sponge microbiome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 9, p. 641–654, 2012.
- HERTWECK, C. The biosynthetic logic of polyketide diversity. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 48, n. 26, p. 4688–4716, 2009.
- HERTWECK, C. Decoding and reprogramming complex polyketide assembly lines: prospects for synthetic biology. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 40, n. 4, p. 189–199, 2015.
- HINGER, I.; ANSORGE, R.; MUSSMANN, M.; ROMANO, S. Phylogenomic analyses of members of the widespread marine heterotrophic genus *Pseudovibrio* suggest distinct evolutionary trajectories and a novel genus, *Polycladidibacter* gen. nov. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 86, n. 4, p. 1–17, 2020.
- HOOFT, J. J. J. VAN DER; MOHIMANI, H.; BAUERMEISTER, A.; DORRESTEIN, P. C.; DUNCAN, K. R.; MEDEMA, M. H. Linking genomics and metabolomics to chart specialized metabolic diversity. **Chemical Society reviews**, v. 49, n. 11, p. 3297–3314, 2020.
- HOSOYA, S.; YOKOTA, A. *Pseudovibrio japonicus* sp. nov., isolated from coastal seawater in Japan. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 9, p. 1952–1955, 2007.
- HUNT, S. Degradation of amino acids accompanying *in vitro* protein hydrolysis. **Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids**, p. 376–398, 1985.
- IMKER, H. J.; WALSH, C. T.; WUEST, W. M. SylC catalyzes ureido-bond formation during biosynthesis of the proteasome inhibitor syringolin A. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 51, p. 18263–18265, 2009.
- IÓCA, L. P.; ROMMINGER, S.; SANTOS, M.F.C.; BANDEIRA, K.F.; RODRIGUES, F.T.; KOSSUGA, M.H.; NICACIO, K.J.; FERREIRA, E.L.F.; MORAIS-URANO, R.P.; PASSOS, M.S.; KOHN, L.K.; ARNS, C.W.; SETTE, L.D.; BERLINCK, R.G.S. A strategy for the rapid identification of fungal metabolites and the discovery of the antiviral activity of pyrenocine a and harzianopyridone. **Quimica Nova**, v. 39, n. 6, p. 720–731, 2016.
- IÓCA, L. P.; NICACIO, K. J.; BERLINCK, R. G. S. Natural products from marine invertebrates and microorganisms in Brazil between 2004 and 2017: Still the challenges, more rewards. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 5, p.

998–1031, 2018.

JAREMKO, M. J.; DAVIS, T. D.; CORPUZ, J. C.; BURKART, M. D. Type II non-ribosomal peptide synthetase proteins: Structure, mechanism, and protein-protein interactions. **Natural Product Reports**, v. 37, n. 3, p. 355–379, 2020.

JENSEN, P. R. Linking species concepts to natural product discovery in the post-genomic era. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 3, p. 219–224, 2010.

KATZ, L.; BALTZ, R. H. Natural product discovery: past, present, and future. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 2–3, p. 155–176, 2016.

KAUTSAR, S. A.; BLIN, K.; SHAW, S.; NAVARRO-MUÑOZ, J. C.; TERLOUW, B. R.; VAN DER HOOFT, J. J. J.; VAN SANTEN, J. A.; TRACANNA, V.; SUAREZ-DURAN, H. G.; PASCAL-ANDREU, V.; SELEM-MOJICA, N.; ALANJARY, M.; ROBINSON, S. L.; LUND, G.; EPSTEIN, S. C.; SISTO, A. C.; CHARKOUDIAN, L. K.; COLLEMARE, J.; LININGTON, R. G.; WEBER, T.; MEDEMA, M. H. MIBiG 2.0: a repository for biosynthetic gene clusters of known function. **Nucleic Acids Research**, v. 48, n. D1, p. D454–D458, 2019.

KEARNS, D. B. A field guide to bacterial swarming motility. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 634–644, 2010.

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C.; THIERER, T.; ASHTON, B.; MEINTJES, P.; DRUMMOND, A. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647–1649, 2012.

KEATINGE-CLAY, A. T. The structures of type I polyketide synthases. **Natural Product Reports**, v. 29, n. 10, p. 1050–1073, 2012.

KOSSUGA, M. H.; ROMMINGER, S.; XAVIER, C.; MILANETTO, M. C.; VALLE, M. Z.; PIMENTA, E. F.; MORAIS, R. P.; CARVALHO, E.; MIZUNO, C. M.; CORADELLO, L. F. C.; BARROSO, V. M.; VACONDIO, B.; JAVAROTI, D. C. D.; SELEGHIM, M. H. R.; CAVALCANTI, B. C.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; LIMA, B. A.; GONÇALVES, R.; BONUGLI-SANTOS, R. C.; SETTE, L. D.; BERLINCK, R. G. S. Evaluating methods for the isolation of marine-derived fungal strains and production of bioactive secondary metabolites. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, p. 257–267, 2012.

KOTOWSKA, M.; PAWLIK, K. Roles of type II thioesterases and their application for secondary metabolite yield improvement. **Applied microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 18, p. 7735–7746, 2014.

LAWTON, L. A.; MORRIS, L. A.; JASPARS, M. A bioactive modified peptide, aeruginosamide, isolated from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 64, n. 14, p. 5329–5332, 1999.

LUESCH, H.; YOSHIDA, W. Y.; MOORE, R. E.; PAUL, V. J. Apramides A–G, novel lipopeptides from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 8, p. 1106–1112, 2000.

MATTINGLY, A. E.; WEAVER, A. A.; DIMKOVIKJ, A.; SHROUT, J. D. Assessing travel conditions: Environmental and host influences on bacterial surface motility. **Journal of Bacteriology**, v. 200, n. 11, p. 1–17, 2018.

MCCAULEY, E. P.; PIÑA, I. C.; THOMPSON, A. D.; BASHIR, K.; WEINBERG, M.; KURZ, S. L.; CREWS, P. Highlights of marine natural products having parallel scaffolds found from marine-derived bacteria, sponges, and tunicates. **Journal of Antibiotics**, v. 73, n. 8, p. 504–525, 2020.

MCCLURE, R. A.; GOERING, A. W.; JU, K. S.; BACCILE, J. A.; SCHROEDER, F. C.; METCALF, W. W.; THOMSON, R. J.; KELLEHER, N. L. Elucidating the rimosamide-detoxin natural product families and their biosynthesis using metabolite/gene cluster correlations. **ACS Chemical Biology**, v. 11, n. 12, p. 3452–3460, 2016.

MCFALL-NGAI, M. ; HADFIELD, M. G.; BOSCH, T. C.G.; CAREY, H. V.; DOMAZET-LOŠO, T.; DOUGLAS, A. E.; DUBILIER, N.; EBERL, G.; FUKAMI, T.; GILBERT, S. F.; HENTSCHEL, U.; KING, N.; KJELLEBERG, S.; KNOLL, A. H.; KREMER, N.; MAZMANIAN, S. K.; METCALF, J. L.; NEALSON, K.; PIERCE, N. E.; RAWLS, J. F.; REID, A.; RUBY, E. G.; RUMPHO, M.; SANDERS, J. G.; TAUTZ, D.; WERNEGREEN, J. J. Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 9, p. 3229–3236, 2013.

MCINTOSH, J. A.; LIN, Z.; TIANERO, M. D. B.; SCHMIDT, E. W. Aestuaramides, a natural library of cyanobactin cyclic peptides resulting from isoprene-derived Claisen rearrangements. **ACS Chemical Biology**, v. 8, n. 5, p. 877–883, 2013.

MEDEMA, M. H.; TAKANO, E.; BREITLING, R. Detecting sequence homology at the gene cluster level with MultiGeneBlast. **Molecular biology and Evolution**, v. 30, n. 5, p. 1218–1223, 2013.

MILSHTEYN, A.; SCHNEIDER, J. S.; BRADY, S. F. Mining the metabiome: Identifying novel natural products from microbial communities. **Chemistry and Biology**, v. 21, n. 9, p. 1211–1223, 2014.

MORTON, J. T.; AKSENOV, A. A.; NOTHIAS, L. F.; FOULDS, J. R.; QUINN, R. A.; BADRI, M. H.; SWENSON, T. L.; VAN GOETHEM, M. W.; NORTHEM, T. R.; VAZQUEZ-BAEZA, Y.; WANG, M.; BOKULICH, N. A.; WATTERS, A.; SONG, S. J.; BONNEAU, R.; DORRESTEIN, P. C.; KNIGHT, R. Learning representations of microbe–metabolite interactions. **Nature Methods**, v. 16, n. 12, p. 1306–1314, 2019.

MOUNCEY, N. J.; OTANI, H.; UDWARY, D.; YOSHIKUNI, Y. New voyages to explore the natural product galaxy. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 46, n. 3–4, p. 273–279, 2019.

NAUGHTON, L. M.; ROMANO, S.; O'GARA, F.; DOBSON, A. D. W. Identification of secondary metabolite gene clusters in the *Pseudovibrio* Genus reveals encouraging biosynthetic potential toward the production of novel bioactive compounds. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1–15, 2017.

NEB-INC. **Tm calculator 1.13.0**. Disponível em: <https://tmcalculator.neb.com/#!/main>.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 2020.

NICACIO, K. J.; IÓCA, L. P.; FRÓES, A. M.; LEOMIL, L.; APPOLINARIO, L. R.; THOMPSON, C. C.; THOMPSON, F. L.; FERREIRA, A. G.; WILLIAMS, D. E.; ANDERSEN, R. J.; EUSTAQUIO, A. S.; BERLINCK, R. G. S. Cultures of the marine

bacterium *Pseudovibrio denitrificans* Ab134 produce bromotyrosine-derived alkaloids previously only isolated from marine sponges. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 2, p. 235–240, 2017.

NIEMANN, H.; MARMANN, A.; LIN, W.; PROKSCH, P. Sponge derived bromotyrosines: structural diversity through natural combinatorial chemistry. **Natural Product Communications**, v. 10, n. 1, p. 219–231, 2015.

O'CONNOR, S. E.; CHEN, H.; WALSH, C. T. Enzymatic assembly of epothilones: the EpoC subunit and reconstitution of the EpoA-ACP/B/C polyketide and nonribosomal peptide interfaces. **Biochemistry**, v. 41, n. 17, p. 5685–5694, 2002.

O'HALLORAN, J. A.; BARBOSA, T. M.; MORRISSEY, J. P.; KENNEDY, J.; O'GARA, F.; DOBSON, A. D. W. Diversity and antimicrobial activity of *Pseudovibrio* spp. from Irish marine sponges. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, n. 6, p. 1495–1508, 2011.

PASSARINI, M. R. Z.; SANTOS, C.; LIMA, N.; BERLINCK, R. G. S.; SETTE, L. D. Filamentous fungi from the Atlantic marine sponge *Dragmacidon reticulatum*. **Archives of Microbiology**, v. 195, n. 2, p. 99–111, 2013.

PAUWELYN, E.; HUANG, C.-J.; ONGENA, M.; LECLÈRE, V.; JACQUES, P.; BLEYAERT, P.; BUDZIKIEWICZ, H.; SCHÄFER, M.; HÖFTE, M. New linear lipopeptides produced by *Pseudomonas cichorii* SF1-54 are involved in virulence, swarming motility, and biofilm formation. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 26, n. 5, p. 585–598, 2013.

PAYNE, J. A. E.; SCHOPPET, M.; HANSEN, M. H.; CRYLE, M. J. Diversity of nature's assembly lines – recent discoveries in non-ribosomal peptide synthesis. **Molecular BioSystems**, v. 13, n. 1, p. 9–22, 2017.

PEIX, A.; RAMÍREZ-BAHENA, M. H.; VELÁZQUEZ, E. The current status on the taxonomy of *Pseudomonas* revisited: An update. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 57, p. 106–116, 2018.

PENESYAN, A.; TEBBEN, J.; LEE, M.; THOMAS, T.; KJELLEBERG, S.; HARDER, T.; EGAN, S. Identification of the antibacterial compound produced by the marine epiphytic bacterium *Pseudovibrio* sp. D323 and related sponge-associated bacteria. **Marine Drugs**, v. 9, n. 8, p. 1391–1402, 2011.

PEREIRA-FO, E. P. **Planejamento fatorial em química: maximizando a obtenção de resultados**. São Carlos: Edufscar, 2015.

PHELAN, V. V.; LIU, W. T.; POGLIANO, K.; DORRESTEIN, P. C. Microbial metabolic exchange-the chemotype-to-phenotype link. **Nature Chemical Biology**, v. 8, n. 1, p. 26–35, 2012.

PHILIPPE, N.; ALCARAZ, J.-P.; COURSANGE, E.; GEISELMANN, J.; SCHNEIDER, D. Improvement of pCVD442, a suicide plasmid for gene allele exchange in bacteria. **Plasmid**, v. 51, n. 3, p. 246–255, 2004.

PITA, L.; RIX, L.; SLABY, B. M.; FRANKE, A.; HENTSCHEL, U. The sponge holobiont in a changing ocean: from microbes to ecosystems. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 46, 2018.

PUCKETT, S. P.; SAMPLES, R. M.; SCHLOSS, P. D.; BALUNAS, M. J. Metabolomics

and the microbiome: Characterizing molecular diversity in complex microbial communities. **Comprehensive Natural Products III**, p. 502–518, 2020.

RAINA, J. B.; TAPIOLAS, D.; MOTTI, C. A.; FORET, S.; SEEMANN, T.; TEBBEN, J.; WILLIS, B. L.; BOURNE, D. G. Isolation of an antimicrobial compound produced by bacteria associated with reef-building corals. **PeerJ**, v. 2016, n. 8, p. e2275, 2016.

RAMEL, C.; TOBLER, M.; MEYER, M.; BIGLER, L.; EBERT, M. O.; SCHELLENBERG, B.; DUDLER, R. Biosynthesis of the proteasome inhibitor syringolin A: The ureido group joining two amino acids originates from bicarbonate. **BMC Biochemistry**, v. 10, n. 1, p. 1–9, 2009.

RAUSCH, C.; HOOF, I.; WEBER, T.; WOHLLEBEN, W.; HUSON, D. H. Phylogenetic analysis of condensation domains in NRPS sheds light on their functional evolution. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, p. 78, 2007.

RAY, L.; MOORE, B. S. Recent advances in the biosynthesis of unusual polyketide synthase substrates. **Natural Product Reports**, v. 33, n. 2, p. 150–161, 2016.

REN, H.; SHI, C.; ZHAO, H. Computational tools for discovering and engineering natural product biosynthetic pathways. **iScience**, v. 23, n. 1, p. 100795, 2020.

RODRIGUES, A. M. S.; ROHÉE, C.; FABRE, T.; BATAILLER, N.; SAUTEL, F.; CARLETTI, I.; NOGUES, S.; SUZUKI, M. T.; STIEN, D. Cytotoxic indole alkaloids from *Pseudovibrio denitrificans* BBCC725. **Tetrahedron Letters**, v. 58, n. 32, p. 3172–3173, 2017.

ROGERS, E. W.; MOLINSKI, T. F. Highly polar spiroisoxazolines from the sponge *Aplysina fulva*. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 7, p. 1191–1194, 2007.

ROGERS, E. W.; OLIVEIRA, M. F. DE; BERLINCK, R. G. S.; KÖNIG, G. M.; MOLINSKI, T. F. Stereochemical heterogeneity in Verongid sponge metabolites. Absolute stereochemistry of (+)-fistularin-3 and (+)-11-epi-fistularin-3 by microscale LCMS-Marfey's analysis. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 6, p. 891–896, 2005.

ROMANO, S. Ecology and biotechnological potential of bacteria belonging to the genus *Pseudovibrio*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 8, p. 1–16, 2018.

ROMANO, S.; DITTMAR, T.; BONDAREV, V.; WEBER, R. J. M.; VIANI, M. R.; SCHULZ-VOGT, H. N. Exo-metabolome of *Pseudovibrio* sp. FO-BEG1 analyzed by ultra-high resolution mass spectrometry and the effect of phosphate limitation. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. e96038, 2014.

ROMANO, S.; FERNÁNDEZ-GUERRA, A.; REEN, F. J.; GLÖCKNER, F. O.; CROWLEY, S. P.; O'SULLIVAN, O.; COTTER, P. D.; ADAMS, C.; DOBSON, A. D. W.; O'GARA, F. Comparative genomic analysis reveals a diverse repertoire of genes involved in prokaryote-eukaryote interactions within the *Pseudovibrio* Genus. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–20, 2016.

RUA, C. P. J.; TRINDADE-SILVA, A. E.; APPOLINARIO, L. R.; VENAS, T. M.; GARCIA, G. D.; CARVALHO, L. S.; LIMA, A.; KRUGER, R.; PEREIRA, R. C.; BERLINCK, R. G.S.; VALLE, R. A. B.; THOMPSON, C. C.; THOMPSON, F. Diversity and antimicrobial potential of culturable heterotrophic bacteria associated with the endemic marine sponge *Arenosclera brasiliensis*. **PeerJ**, v. 2014, n. 1, p. e419, 2014.

RUA, C. P. J.; OLIVEIRA, L. S.; FROES, A.; TSCHOEKE, D. A.; SOARES, A. C.; LEOMIL, L.; GREGORACCI, G. B.; COUTINHO, R.; HAJDU, E.; THOMPSON, C. C.; BERLINCK, R. G. S.; THOMPSON, F. L. Microbial and functional biodiversity patterns in sponges that accumulate bromopyrrole alkaloids suggest horizontal gene transfer of halogenase genes. **Microbial ecology**, v. 76, n. 3, p. 825–838, 2018.

SALIB, M. N.; MOLINSKI, T. F. Cyclic hexapeptide dimers, antatollamides A and B, from the ascidian *Didemnum molle*. A tryptophan-derived auxiliary for L- and D-amino acid assignments. **Journal of Organic Chemistry**, v. 82, n. 19, p. 10181–10187, 2017.

SCHWEDT, A.; SEIDEL, M.; DITTMAR, T.; SIMON, M.; BONDAREV, V.; ROMANO, S.; LAVIK, G.; SCHULZ-VOGT, H. N. Substrate use of *Pseudovibrio* sp. growing in ultra-oligotrophic seawater. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0121675, 2015.

SCOTT, T. A.; PIEL, J. The hidden enzymology of bacterial natural product biosynthesis. **Nature Reviews Chemistry**, v. 3, n. 7, p. 404–425, 2019.

SERTAN-DE GUZMAN, A. A.; PREDICALA, R. Z.; BERNARDO, E. B.; NEILAN, B. A.; ELARDO, S. P.; MANGALINDAN, G. C.; TASDEMIR, D.; IRELAND, C. M.; BARRAQUIO, W. L.; CONCEPCION, G. P. *Pseudovibrio denitrificans* strain Z143-1, a heptylprodigiosin-producing bacterium isolated from a Philippine tunicate. **FEMS Microbiology Letters**, v. 277, n. 2, p. 188–196, 2007.

SHIEH, W. Y.; LIN, Y. TE; JEAN, W. D. *Pseudovibrio denitrificans* gen. nov., sp. nov., a marine, facultatively anaerobic, fermentative bacterium capable of denitrification. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 2307–2312, 2004.

SILVA, M. M.; BERGAMASCO, J.; LIRA, S. P.; LOPES, N. P.; HAJDU, E.; PEIXINHO, S.; BERLINCK, R. G. S. Dereplication of bromotyrosine-derived metabolites by LC-PDA-MS and analysis of the chemical profile of 14 *Aplysina* sponge specimens from the Brazilian Coastline. **Australian Journal of Chemistry**, v. 63, n. 6, p. 886–894, 2010.

STACHELHAUS, T.; MOOTZ, H. D.; BERGENDAHL, V.; MARAHIEL, M. A. Peptide bond formation in nonribosomal peptide biosynthesis. Catalytic role of the condensation domain. **The Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 35, p. 22773–22781, 1998.

STILL, P. C.; JOHNSON, T. A.; THEODORE, C. M.; LOVERIDGE, S. T.; CREWS, P. Scrutinizing the scaffolds of marine biosynthetics from different source organisms: Gram-negative cultured bacterial products enter center stage. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 3, p. 690–702, 2014.

SWEET, M.; BULLING, M.; CERRANO, C. A novel sponge disease caused by a consortium of micro-organisms. **Coral Reefs**, v. 34, n. 3, p. 871–883, 2015.

TAN, L. T.; WILLIAMSON, R. T.; GERWICK, W. H.; WATTS, K. S.; MCGOUGH, K.; JACOBS, R. cis,cis- and trans,trans-Ceratospongamide, new bioactive cyclic heptapeptides from the Indonesian red alga *Ceratodictyon spongiosum* and symbiotic sponge *Sigmatocia symbiotica*. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 65, n. 2, p. 419–425, 2000.

TAUTZ, T. HOFFMANN, J.; HOFFMANN, T.; STEINMETZ, H.; WASHAUSEN, P.;

KUNZE, B.; HUCH, V.; KITSCHKE, A.; REICHENBACH, H.; HÖFLE, G.; MÜLLER, T.; KALESSE, M. Isolation, structure elucidation, biosynthesis, and synthesis of antalid, a secondary metabolite from *Polyangium* species.. **Organic Letters**, v. 18, n. 11, p. 2560–2563, 2016.

TAYLOR, M. W.; RADAX, R.; STEGER, D.; WAGNER, M. Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, n. 2, p. 295–347, 2007.

THACKER, R. W.; FREEMAN, C. J. **Sponge-Microbe Symbioses. Recent Advances and New Directions**. 1. ed. United States: Elsevier Ltd., 2012. v. 62

THOMAS, T. *et al.* Diversity, structure and convergent evolution of the global sponge microbiome. **Nature Communications**, v. 7, 2016.

TILLET, D.; DITTMANN, E.; ERHARD, M.; DÖHREN, H. VON; BÖRNER, T.; NEILAN, B. A. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: An integrated peptide-polyketide synthetase system. **Chemistry and Biology**, v. 7, n. 10, p. 753–764, 2000.

TIMMERMANS, M. L.; PICOTT, K. J.; UCCIFERRI, L.; ROSS, A. C. Culturing marine bacteria from the genus *Pseudoalteromonas* on a cotton scaffold alters secondary metabolite production. **MicrobiologyOpen**, v. 8, n. 5, p. 1–10, 2019.

TRINDADE-SILVA, A. E.; RUA, C. P. J.; SILVA, G. G. Z.; DUTILH, B. E.; MOREIRA, A. P. B.; EDWARDS, R. A.; HAJDU, E.; LOBO-HAJDU, G.; VASCONCELOS, A. T.; BERLINCK, R. G. S.; THOMPSON, F. L. Taxonomic and functional microbial signatures of the endemic marine sponge *Arenosclera brasiliensis*. **PloS one**, v. 7, n. 7, p. e39905, 2012.

TRINDADE-SILVA, A. E.; RUA, C. P. J.; ANDRADE, B. G. N.; VICENTE, A. C. P.; SILVA, G. G. Z.; BERLINCK, R. G. S.; THOMPSON, F. L.. Polyketide synthase gene diversity within the microbiome of the sponge *Arenosclera brasiliensis*, endemic to the Southern Atlantic Ocean. **Applied and environmental microbiology**, v. 79, n. 5, p. 1598–1605, 2013.

TYMIAK, A. A.; RINEHART, K. L. Biosynthesis of dibromotyrosine-derived antimicrobial compounds by the marine sponge *Aplysina fistularis* (Verongia aurea). **Journal of the American Chemical Society**, v. 103, n. 22, p. 6763–6765, 1981.

VERSLUIS, D.; NIJSSE, B.; NAIM, M. A.; KOEHORST, J. J.; WIESE, J.; IMHOFF, J. F.; SCHAAP, P. J.; PASSEL, M. W. J. VAN; SMIDT, H.; SIPKEMA, D. Comparative genomics highlights symbiotic capacities and high metabolic flexibility of the marine genus *Pseudovibrio*. **Genome Biology and Evolution**, v. 10, n. 1, p. 125–142, 2018.

VERSTRAETEN, N.; BRAEKEN, K.; DEBKUMARI, B.; FAUVART, M.; FRANSAER, J.; VERMANT, J.; MICHIELS, J. Living on a surface: swarming and biofilm formation. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 10, p. 496–506, 2008.

VIZCAINO, M. I. **The chemical defense of *Pseudopterogordia americana*: a focus on the antimicrobial potential of *Pseudovibrio* sp.** Medical University of South Caroline, 2011.

WALSH, C. T.; TANG, Y. **Natural Product Biosynthesis**. The Royal Society of Chemistry, 2017.

- WANG, K. L.; XU, Y.; LU, L.; LI, Y.; HAN, Z.; ZHANG, J.; SHAO, C. L.; WANG, C. Y.; QIAN, P. Y. Low-toxicity diindol-3-ylmethanes as potent antifouling compounds. **Marine Biotechnology**, v. 17, n. 5, p. 624–632, 2015.
- WATERS, A. L.; PERAUD, O.; KASANA, N.; SIMS, J. W.; KOTHALAWALA, N.; ANDERSON, M. A.; ABBAS, S. H.; RAO, K. V.; JUPALLY, V. R.; KELLY, M.; DASS, A.; HILL, R. T.; HAMANN, M. T. An analysis of the sponge *Acanthostrongylophora igens*’ microbiome yields an actinomycete that produces the natural product manzamine A. **Frontiers in Marine Science**, v. 1, p. 54, 2014.
- WHITELEY, M.; DIGGLE, S. P.; GREENBERG, E. P. Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. **Nature**, v. 551, n. 7680, p. 313–320, 2017.
- XU, G.; WANG, B. G. Independent evolution of six families of halogenating enzymes. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. e0154619, 2016.
- XU, Y.; LI, Q.; TIAN, R.; LAI, Q.; ZHANG, Y. *Pseudovibrio hongkongensis* sp. nov., isolated from a marine flatworm. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 108, n. 1, p. 127–132, 2015.
- XUE, M.; KIM, C. S.; HEALY, A. R.; WERNKE, K. M.; WANG, Z.; FRISCHLING, M. C.; SHINE, E. E.; WANG, W.; HERZON, S. B.; CRAWFORD, J. M. Structure elucidation of colibactin and its DNA cross-links. **Science**, v. 365, n. 6457, p. eaax2685, 2019.
- YANG, J. Y.; PHELAN, V. V.; SIMKOVSKY, R.; WATROUS, J. D.; TRIAL, R. M.; FLEMING, T. C.; WENTER, R.; MOORE, B. S.; GOLDEN, S. S.; POGLIANO, K.; DORRESTEIN, P. C. Primer on agar-based microbial imaging mass spectrometry. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 22, p. 6023–6028, 2012.
- YEH, E.; KOHLI, R. M.; BRUNER, S. D.; WALSH, C. T. Type II thioesterase restores activity of a NRPS module stalled with an aminoacyl-S-enzyme that cannot be elongated. **ChemBioChem**, v. 5, n. 9, p. 1290–1293, 2004.
- ZHANG, Y.; LI, Q.; TIAN, R.; LAI, Q.; XU, Y. *Pseudovibrio stylochi* sp. nov., isolated from a marine flatworm. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 5, p. 2025–2029, 2016.
- ZHU, X. M.; HACKL, S.; THAKER, M. N.; KALAN, L.; WEBER, C.; URGAST, D. S.; KRUPP, E. M.; BREWER, A.; VANNER, S.; SZAWIOLA, A.; YIM, G.; FELDMANN, J.; BECHTHOLD, A.; WRIGHT, G. D.; ZECHEL, D. L. Biosynthesis of the fluorinated natural product nucleocidin in *Streptomyces calvus* is dependent on the bldA-specified Leu-tRNAUUA molecule. **ChemBioChem**, v. 16, n. 17, p. 2498–2506, 2015.
- ZIEMERT, N.; ALANJARY, M.; WEBER, T. The evolution of genome mining in microbes-a review. **Natural Product Reports**, v. 33, n. 8, p. 988–1005, 2016.

8 APÊNDICE

Lista de Tabelas

Tabela S1 – Lista de primers e respectivas sequências. SOE-PCR <i>overhangs</i> são mostrados em azul, sítios de restrição em vermelho. Bases aleatórias para a inserção dos sítios de restrição estão destacadas em itálico.	151
Tabela S2 – Pares de primers utilizados para amplificar gaps putativos no genoma de <i>P. brasiliensis</i> Ab134. A sequência 5 → 3' de cada primers é apresentada na Tabela S1.	153
Tabela S3 – Pares de primers para amplificar fragmentos de DNA <i>up</i> e <i>downstream</i> aos genes alvos, e pares de primers para conferir mutantes por <i>single</i> e <i>double crossover</i> . A sequência 5 → 3' e sítio de ligação de cada primers é apresentada na Tabela S1.	154
Tabela S4 – Lista de linhagens de <i>Pseudovibro</i> spp. e <i>Pseudomonas</i> spp. que contém <i>ppp</i> BGC em seus genomas.	155
Tabela S5 – Resultado do bioensaio de formação de biofilme para de <i>P. brasiliensis</i> Ab134 WT e mutantes <i>pppA</i> e <i>pppD</i> em dois períodos de crescimento (24h e 48 h), utilizando-se o mesmo inóculo.	158
Tabela S6 – Classes de peptídeos não-ribossomais que contém uma conexão ureia.	159
Tabela S7 – Produtos naturais bacterianos que contém resíduos Dha/Dhb.	162
Tabela S8 – Peptídeos que contém o heterociclo tiazol em sua estrutura.	164

Lista de Figuras

Figura S1 – Resultado da análise por multigene blast, utilizando o NRPS-PKS BGC de <i>P. brasiliensis</i> Ab134 como <i>query</i>	166
Figura S2 – Arquitetura dos domínios codificados pelo <i>ppp</i> BGC de <i>P. brasiliensis</i> Ab134 e BGC homólogos de <i>Pseudovibrio</i> spp. e <i>Pseudomonas</i> spp. (versão completa da Figura 5.9).	167
Figura S3 – Fotos comparando-se o fenótipo de <i>swarming</i> (A) e <i>swimming</i> (B) de <i>P. brasiliensis</i> Ab134 WT e os mutantes <i>pppA</i> e <i>pppD</i> à 30 °C.....	168
Figura S4 – Espectro de RMN de ¹ H do composto 1 , fração F2B67D3 (900 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ + TFA).	169
Figura S5 – Espectro de RMN de ¹³ C DEPTQ do composto 1 , fração F2B67D3 (226 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ + TFA).....	169
Figura S6 – Espectro de RMN HSQC do composto 1 , fração F2B67D3 (226 MHz:900 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ + TFA).....	170
Figura S7 – Espectro de RMN de HSQC-TOCSY do composto 1 , fração F2B67D3 (226 MHz:900 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ + TFA).	170
Figura S8 – Espectro de RMN COSY do composto 1 , fração F2B67D3 (900 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ + TFA).	171
Figura S9 – Espectro de RMN de HMBC do composto 1 , fração F2B67D3 (226 MHz:900 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ + TFA).	171
Figura S10 – Espectro de RMN de ROESY do composto 1 , fração F2B67D3 (900 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ + TFA).	172
Figura S11 – Espectro de RMN de ¹⁵ N do composto 1 , fração F2B67D3 (91 MHz:900 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ + TFA).....	172
Figura S12 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 1 + L-FDTA, L-Tyr + L-FDTA e L-Tyr + D-FDTA, respectivamente.	173
Figura S13 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 1 + L-FDTA, L-Ala + L-FDTA e L-Ala + D-FDTA, respectivamente.	173
Figura S14 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 1 + L-FDTA, L-Arg + L-FDTA e L-Arg + D-FDTA, respectivamente.	174
Figura S15 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 1 + L-FDTA, L-Pro + L-FDTA e L-Pro + D-FDTA, respectivamente.	174
Figura S16 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 1 + L-FDTA, L-Glu + L-FDTA e L-Glu + D-FDTA, respectivamente.	175
Figura S17 – Espectro de RMN de ¹ H do composto 2 , frações F2B67D1/FD2B3D1 (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ + TFA).....	176

Figura S18 – Espectro de RMN de ^{13}C do composto 2 , frações F2B67D1/FD2B3D1 (150 MHz, DMSO- d_6 + TFA).....	176
Figura S19 – Espectro de RMN de HSQC do composto 2 , frações F2B67D1/FD2B3D1 (150 MHz:600 MHz, DMSO- d_6 + TFA).	177
Figura S20 – Espectro de RMN de COSY do composto 2 , frações F2B67D1/FD2B3D1 (600 MHz, DMSO- d_6 + TFA).....	177
Figura S21 – Espectro de RMN de HSQC-TOCSY do composto 2 , frações F2B67D1/FD2B3D1 (150 MHz:600 MHz, DMSO- d_6 + TFA).	178
Figura S22 – Espectro de RMN de HMBC do composto 2 , frações F2B67D1/FD2B3D1 (150 MHz:600 MHz, DMSO- d_6 + TFA).	178
Figura S23 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 2 + L-FDTA, L-Tyr + L-FDTA e L-Tyr + D-FDTA, respectivamente.	179
Figura S24 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 2 + L-FDTA, L-Ala + L-FDTA e L-Ala + D-FDTA, respectivamente.	179
Figura S25 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 2 + L-FDTA, L-Arg + L-FDTA e L-Arg + D-FDTA, respectivamente.	180
Figura S26 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 2 + L-FDTA, L-Pro + L-FDTA e L-Pro + D-FDTA, respectivamente.	180
Figura S27 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 2 + L-FDTA, L-Glu + L-FDTA e L-Glu + D-FDTA, respectivamente.	181
Figura S28 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 3 + L-FDTA, 4 + L-FDTA e Gly + D-FDTA, respectivamente.....	182
Figura S29 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 3 + L-FDTA, L-Tyr + L-FDTA e L-Tyr + D-FDTA, respectivamente.	182
Figura S30 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 3 + L-FDTA, L-Arg + L-FDTA e L-Arg + D-FDTA, respectivamente.	183
Figura S31 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 3 + L-FDTA, L-Pro + L-FDTA e L-Pro + D-FDTA, respectivamente.	183
Figura S32 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 3 + L-FDTA, L-Glu + L-FDTA e L-Glu + D-FDTA, respectivamente.	184
Figura S33 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 4 + L-FDTA, L-Tyr + L-FDTA e L-Tyr + D-FDTA, respectivamente.	185

Figura S34 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 4 + L-FDTA, L-Arg + L-FDTA e L-Arg + D-FDTA, respectivamente.	185
Figura S35 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 4 + L-FDTA, L-Pro + L-FDTA e L-Pro + D-FDTA, respectivamente.	186
Figura S36 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 4 + L-FDTA, L-Glu + L-FDTA e L-Glu + D-FDTA, respectivamente.	186
Figura S37 – Espectro de RMN de ^1H da fração C23C1B (7), 600 MHz, DMSO- d_6 + TFA.	187
Figura S38 – Espectro de RMN de ^{13}C da fração C23C1B (7), 150 MHz, DMSO- d_6 + TFA.	187
Figura S39 – Espectro de RMN de HSQC da fração C23C1B (7), 150 MHz:600 MHz, DMSO- d_6 + TFA.	188
Figura S40 – Espectro de RMN de HSQC-TOCSY da fração C23C1B (7), 150 MHz:600 MHz, DMSO- d_6 + TFA.	188
Figura S41 – Espectro de RMN de COSY da fração C23C1B (7), 600 MHz, DMSO- d_6 + TFA.	189
Figura S42 – Espectro de RMN de HMBC da fração C23C1B (7), 150 MHz:600 MHz, DMSO- d_6 + TFA.	189
Figura S43 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 7 + L-FDTA, L-Tyr + L-FDTA e L-Tyr + D-FDTA, respectivamente.	190
Figura S44 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 7 + L-FDTA, L-Ala + L-FDTA e L-Ala + D-FDTA, respectivamente.	190
Figura S45 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 7 + L-FDTA, L-Arg + L-FDTA e L-Arg + D-FDTA, respectivamente.	191
Figura S46 - Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 7 + L-FDTA, L-Pro + L-FDTA e L-Pro + D-FDTA, respectivamente.	191
Figura S47 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 7 + L-FDTA, L-Glu + L-FDTA e L-Glu + D-FDTA, respectivamente.	192
Figura S48 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 7 + L-FDTA, L-Val + L-FDTA e L-Val + D-FDTA, respectivamente.	192
Figura S49 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 8/9 + L-FDTA, L-Ile + L-FDTA e L-Ile + D-FDTA, respectivamente.	193

Figura S50 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 8/9 + L-FDTA, L-Leu + L-FDTA e L-Leu + D-FDTA, respectivamente.	193
Figura S51 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 8/9 + L-FDTA, L-Ile + L-FDTA e L-Leu + L-FDTA, respectivamente.	194
Figura S52 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 8/9 + L-FDTA, L-Tyr + L-FDTA e L-Tyr + D-FDTA, respectivamente.	194
Figura S53 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 8/9 + L-FDTA, L-Ala + L-FDTA e L-Ala + D-FDTA, respectivamente.	195
Figura S54 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 8/9 + L-FDTA, L-Arg + L-FDTA e L-Arg + D-FDTA, respectivamente.	195
Figura S55 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 8/9 + L-FDTA, L-Pro + L-FDTA e L-Pro + D-FDTA, respectivamente.	196
Figura S56 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 8/9 + L-FDTA, L-Glu + L-FDTA e L-Glu + D-FDTA, respectivamente.	196
Figura S57 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 10 + L-FDTA e L-Gly + D-FDTA, respectivamente.	197
Figura S58 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 10 + L-FDTA, L-Tyr + L-FDTA e L-Tyr + D-FDTA, respectivamente.	197
Figura S59 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 10 + L-FDTA, L-Arg + L-FDTA e L-Arg + D-FDTA, respectivamente.	198
Figura S60 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 10 + L-FDTA, L-Pro + L-FDTA e L-Pro + D-FDTA, respectivamente.	198
Figura S61 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 10 + L-FDTA, L-Glu + L-FDTA e L-Glu + D-FDTA, respectivamente.	199
Figura S62 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 10 + L-FDTA, L-Val + L-FDTA e L-Val + D-FDTA, respectivamente.	199
Figura S63 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 11/12 + L-FDTA, L-Tyr + L-FDTA e L-Tyr + D-FDTA, respectivamente.	200
Figura S64 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 11/12 + L-FDTA, L-Ala + L-FDTA e L-Ala + D-FDTA, respectivamente.	200

Figura S65 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 11/12 + L-FDTA, L-Arg + L-FDTA e L-Arg + D-FDTA, respectivamente.	201
Figura S66 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 11/12 + L-FDTA, L-Pro + L-FDTA e L-Pro + D-FDTA, respectivamente.	201
Figura S67 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 11/12 + L-FDTA, L-Glu + L-FDTA e L-Glu + D-FDTA, respectivamente.	202
Figura S68 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 11/12 + L-FDTA, L-Ile + L-FDTA e L-Ile + D-FDTA, respectivamente.	202
Figura S69 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 11/12 + L-FDTA, L-Leu + L-FDTA e L-Leu + D-FDTA, respectivamente.	203
Figura S70 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 11/12 + L-FDTA, L-Ile + L-FDTA e L-Leu + L-FDTA, respectivamente.	203

Tabela S1 – Lista de primers e respectivas sequências. SOE-PCR *overhangs* são mostrados em azul, sítios de restrição em vermelho. Bases aleatórias para a inserção dos sítios de restrição estão destacadas em *itálico*.

Primers	Sequência 5'→3'
Mapa genômico: gaps e confirmação de plasmídeos	
oLI5	GGTTGGAGTTGAGGCATTG
oLI6	GACCACATGCCTCATGAAC
oLI7	CCTTGGCATTATCTCCTGC
oLI8	CTTCGACGGTGCTCTTTATATG
oLI9	GGAACAACCTCGGGCAATC
oLI10	GCTATCGTTTACTGGAACACG
oLI15	GTAGGTTGGTTTGCTCAGCA
oLI16	GGTACAACGGATCAGTTCTG
oLI17	GCTGCTGCTTCTGGTCAG
oLI18	GTGTCTGCAATTGGGCTC
oLI19	GGAATAAGGGCACATCTGC
oLI20	CCTGAGCAAATGCTTCAAG
oLI21	GAAGAGCTGGAAGCGAAC
oLI22	CCATCAGCGCGATAAAATC
oLI29	GTCGGCTTCAGCAATGGCTC
oLI30	CAAATCTTGTTCTGGCCCCATC
oLI31	GGAGCTCGGTACTGGCATCTGG
Inativação do gene <i>pppA</i>	
P_neo_f	GCAAGGGCTGCTAAAGGAAG
P_neo_r	ACGGAAATGTTGAATACTCATACTC
TP_ctg3-43_f	CAGCAAGAAAAGCTAGGTTTGAG
TP_ctg3-43_r	GTTCTGGTGCTCCGGATAG
P1_XbaI_NRPSup_f	AAC TGCTCTAG ACAAACCACACTCCGCAGAGAG
P2_NRPSup_r	CTACGTTGGAAAGACTAAACTCACC
P3_NRPSup_neo_f	TGTTTTATGGGTGAGTTTAGTCTTTCCAACGTAG GCAA GGGCTGCTAAAGGAAG
P4_NRPSdown_neo_r	GCGTCAGGAAAATTCTTCGGCTG ACGGAAATGTTGAA TACTCATACTC
P5_NRPSdown_f	CAGCCGAAGAATTTTCCTGAC
P6_NRPSdown_XbaI_r	AAC TGCTCTAG AGCTGTTCCCAATAGGCCTTC

Continua →

Continuação da Tabela S1

Inativação do gene <i>pppD</i>	
P_neo_f	GCAAGGGCTGCTAAAGGAAG
P_neo_r	ACGGAAATGTTGAATACTCATACTC
oLI1	AACTGCTCTAGACACAAGACAACCTGATTACG
oLI2	GCTTCCTTTAGCAGCCCTTGCATGTGAGATAGTGCTG TTCATG
oLI3	AGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGCTAGAT GACGTGCTCAGT
oLI4	AACTGCTCTAGACTCAAGAATGGTTTCAAACCTC
oLI23	GCTGGTGGGAGAGCTCTATATC
oLI24	CGATCAGTTAGCTCAAGAGATTG
Inativação dos genes <i>pppH, I e J</i>	
oLI32	GTCTTCTTCAGCAGTTTTTTGTTGTATGGGTTCATTT TACACC
oLI33	AACTGTCTAGACAGTCATCATCGTGATGTC
oLI34	AACTGTCTAGACATCTGAGCGGCTTCTAT
oLI35	CAACAAAAAACTGCTGAAGAGA
oLI36	CTGACCAAACGCTACGTTCCCATGGGCATGAGAATCT CCAAGCA
oLI37	AACTGTCTAGAGATCTCCAAAGATGCTACGATC
oLI38	AACTGTCTAGACGTAGCTCTCCAAACTTTTCG
oLI39	CATGGGAACGTAGCGTTTG
oLI40	AAGGCTGAGTAAAGCAACCTCGTCGGTTTCAAGCTGA GGTCG
oLI41	AACTGTCTAGAGACAGCCTCTACTTACACCA
oLI42	AACTGTCTAGATGGTCATCAACCTAGAACTCC
oLI43	GACGAGGTTGCTTTACTCAG
oLI44	AACTGGAGCTCCGTAGCTCTCCAAACTTTTCG
oLI45	GCAGATTGCGAGTGTAAGGAAAG
oLI46	AACTGGAGCTCTGGTCATCAACCTAGAACTCC

Tabela S2 – Pares de primers utilizados para amplificar gaps putativos no genoma de *P. brasiliensis* Ab134. A sequência 5 → 3' de cada primers é apresentada na Tabela S1.

Amplicon	Par de primers
Plasmídeo NODE2	oLI15/oLI16
Plasmídeo NODE3	oLI17/oLI18
Plasmídeo NODE6	oLI19/oLI20
Plasmídeo NODE7	oLI21/oLI22
NODE1+NODE4	oLI5/oLI8
NODE1+NODE5	oLI5/oLI10; oLI5/oLI30
NODE4+NODE1	oLI7/oLI6; oLI7/oLI31
NODE4+NODE5	oLI7/oLI10; oLI7/oLI30
NODE5+NODE1	oLI9/oLI5; oLI9/oLI31; oLI29/oLI5; oLI29/oLI31
NODE5+NODE4	oLI9/oLI8; oLI29/oLI8
Plasmídeo NODE4	oLI7/oLI8
Plasmídeo NODE5	oLI9/oLI10; oLI29/oLI30; oLI9/oLI30; oLI10/oLI29
Cromossomo NODE1	oLI5/oLI6; oLI5/oLI31

Tabela S3 – Pares de primers para amplificar fragmentos de DNA *up* e *downstream* aos genes alvos, e pares de primers para conferir mutantes por *single* e *double crossover*. A sequência 5 → 3' e sítio de ligação de cada primers é apresentada na Tabela S1.

Amplicon	Par de primers
<i>pppA</i> up homology arm	P1_RE_NRPSup_f/P2_NRPSup_r
<i>pppA</i> down homology arm	P5_NRPSdown_f/P6_NRPSdown_XbaI_r
<i>neo</i> for SOE-PCR <i>pppA</i>	P3_NRPSup_neo_f/P4_NRPSdown_neo_r
SCO up <i>pppA</i> ⁻	TP_ctg3-43_f/P_neo_r
SCO down <i>pppA</i> ⁻	TP_ctg3-43_r/P_neo_f
DCO <i>pppA</i> ⁻	TP_ctg3-43_f/TP_ctg3-43_r
<i>pppD</i> up homology arm	oLI1/oLI2
<i>pppD</i> down homology arm	oLI3/oLI4
<i>neo</i> for SOE-PCR <i>pppD</i>	P_neo_f/P_neo_r
SCO up <i>pppD</i> ⁻	oLI23/P_neo_r
SCO down <i>pppD</i> ⁻	oLI24/P_neo_f
DCO <i>pppD</i> ⁻	oLI23/oLI24
<i>pppH</i> up homology arm	oLI32/oLI33
<i>pppH</i> down homology arm	oLI34/oLI35
SCO up <i>pppH</i> ⁻	oLI38/pDS132_r
SCO down <i>pppH</i> ⁻	P2_NRPSup_r/pDS132_f
DCO <i>pppH</i> ⁻	oLI38/P2_NRPSup_r
<i>pppI</i> up homology arm	oLI36/oLI37
<i>pppI</i> down homology arm	oLI44/oLI39
SCO up <i>pppI</i> ⁻	oLI45/pDS132_f
SCO down <i>pppI</i> ⁻	oLI33/pDS132_r
DCO <i>pppI</i> ⁻	oLI33/oLI45
<i>pppJ</i> up homology arm	oLI40/oLI41
<i>pppJ</i> down homology arm	oLI42/oLI43
SCO up <i>pppJ</i> ⁻	oLI45/pDS132_f
SCO down <i>pppJ</i> ⁻	oLI37/pDS132_r
DCO <i>pppJ</i> ⁻	oLI37/oLI45

Tabela S4 – Lista de linhagens de *Pseudovibrio* spp. e *Pseudomonas* spp. que contém *ppp* BGC em seus genomas.

Número acesso NCBI	Origem	Organismo
	esponja marinha <i>Arenosclera brasiliensis</i>	<i>Pseudovibrio brasiliensis</i> Ab134
NZ_FREX01000017	esponja marinha <i>Spongia officinalis</i>	<i>Pseudovibrio</i> sp. Alg231-02
NZ_LCWX01000112	esponja marinha <i>Polymastia penicillus</i>	<i>Pseudovibrio</i> sp. POLY-S9
NZ_LMCB01000043	esponja marinha <i>Axinella dissimilis</i>	<i>Pseudovibrio axinellae</i> Ad2
NZ_FOFM01000016	esponja marinha <i>Axinella dissimilis</i>	<i>Pseudovibrio axinellae</i> DSM24994
NZ_LMCI01000029	esponja marinha <i>Axinella dissimilis</i>	<i>Pseudovibrio</i> sp. W64
NZ_LMCJ01000042	esponja marinha <i>Axinella dissimilis</i>	<i>Pseudovibrio</i> sp. W74
NZ_LMCK01000096	esponja marinha <i>Axinella dissimilis</i>	<i>Pseudovibrio</i> sp. WM33
NZ_LMCH01000003	esponja marinha <i>Axinella dissimilis</i>	<i>Pseudovibrio</i> sp. Ad5
NZ_LMCC01000034	esponja marinha <i>Axinella dissimilis</i>	<i>Pseudovibrio</i> sp. Ad13
NZ_LMCD01000015	esponja marinha <i>Axinella dissimilis</i>	<i>Pseudovibrio</i> sp. Ad14
NZ_LMCE01000064	esponja marinha <i>Axinella dissimilis</i>	<i>Pseudovibrio</i> sp. Ad26
NZ_LMCF01000190	esponja marinha <i>Axinella dissimilis</i>	<i>Pseudovibrio</i> sp. Ad37
NZ_LMCFG01000068	esponja marinha <i>Axinella dissimilis</i>	<i>Pseudovibrio</i> sp. Ad46
NZ_FNLB01000004	tunicado <i>Synoicum adareanum</i>	<i>Pseudovibrio</i> sp. Tun.PSC04-5.I4
NZ_FPBD01000007	água do mar	<i>Pseudovibrio denitrificans</i> DSM17465
BAZK01000008	água do mar	<i>Pseudovibrio denitrificans</i> JCM12308

Continua →

Continuação da Tabela S4

LT629972	fitopatógeno <i>Oryza sativa</i>	<i>Pseudomonas fuscovaginae</i> LMG2158
LT629777	planta <i>Asplenium nidus</i>	<i>Pseudomonas asplenii</i> ATCC 23835
NZ_CP029608	solo	<i>Pseudomonas kribbensis</i> 46-2
NZ_LN847264	água	<i>Pseudomonas</i> sp. CCOS 191
NC_008027	mosca <i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Pseudomonas entomophila</i> L48
CP022313	planta <i>Leonotis nepetifolia</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> NEP1
NZ_CP011566	raiz da planta <i>Conyza canadensis</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. DR 5-09
LT629788	amostragem geral (portão)	<i>Pseudomonas moraviensis</i> BS3668
LT629709	solo	<i>Pseudomonas reinekei</i> BS3776
NZ_LT962480	planta <i>Prunus</i> sp.	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> CFBP4215
LT629769	espiga de milho	<i>Pseudomonas syringae</i> 31R1
NZ_LT855380	fitopatógeno de árvore de cereja	<i>Pseudomonas viridiflava</i> CFBP1590
NC_005773	fitopatógeno <i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i> 1448A
NZ_CP020351	fitopatógeno de pepino	<i>Pseudomonas amygdali</i> pv. <i>lachrymans</i> NM002
NZ_CP008742	fitopatógeno <i>Olea europaea</i>	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> NCPPB 3335
CM001986	fitopatógeno <i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> SM
NZ_LT962481	fitopatógeno <i>Citrus reticulata</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> CFB2118
NZ_LT963391	fitopatógeno <i>Prunus</i> sp.	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>cerasicola</i> CFB6109

Continua →

Continuação da Tabela S4

NZ_CP013183	fitopatógeno <i>Triticum aestivum</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lapse</i> ATCC 10859
NC_007005	fitopatógeno de feijão	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a
NZ_CP028490	fitopatógeno <i>Triticum aestivum</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> LMG5095
CM001763	fitopatógeno <i>Panicum miliaceum</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> B64
NZ_CP006256	fitopatógeno <i>Panicum miliaceum</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> HS191
NZ_CP005969	fitopatógeno <i>Pyrus communis</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> B301D
NZ_LT963395	fitopatógeno de árvore de cereja	<i>Pseudomonas cerasi</i> PL963
NZ_CP026568	planta <i>Prunus avium</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> Pss9097
NZ_CP026558	planta <i>Prunus avium</i>	<i>Pseudomonas amygdali</i> pv. <i>morsprunorum</i> R15244

Tabela S5 – Resultado do bioensaio de formação de biofilme para de *P. brasiliensis* Ab134 WT e mutantes *pppA* e *pppD* em dois períodos de crescimento (24h e 48 h), utilizando-se o mesmo inóculo.

Absorbância (595 nm)								
24h (réplicas)	1	2	3	4	5	6	Média	Desvio
MB (branco)	0,000	0,001	-0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
Ab134-WT	2,344	2,261	2,112	2,264	2,161	2,735	2,735	0,223
<i>pppA</i> -MT#01	4,264	3,542	3,224	3,442	3,432	4,174	4,174	0,431
<i>pppA</i> -MT#45	3,716	3,418	3,64	3,53	3,182	4,184	4,184	0,337
<i>pppA</i> -MT#47	3,994	3,054	3,2	3,052	3,2466	3,890	3,890	0,424
<i>pppD</i> -MT#24	0,445	0,526	0,396	0,406	0,407	0,428	0,428	0,048
<i>pppD</i> -MT#67	0,512	0,52	0,464	0,431	0,428	0,449	0,449	0,040
48h (réplicas)	1	2	3	4	5	6	Média	Desvio
MB (branco)	0,000	-0,001	-0,003	0,000	-0,002	0,004	0,004	0,002
Ab134-WT	4,708	4,604	3,976	3,938	4,396	4,788	4,788	0,369
<i>pppA</i> -MT#01	6,396	5,568	5,528	5,352	6,224	6,304	6,304	0,461
<i>pppA</i> -MT#45	7,252	5,56	4,772	5,308	6,124	5,924	5,924	0,846
<i>pppA</i> -MT#47	6,596	6,736	4,804	4,816	4,588	5,448	5,448	0,950
<i>pppD</i> -MT#24	1,24	1,05	1,456	1,256	1,312	2,902	2,902	0,682
<i>pppD</i> -MT#67	2,296	2,716	2,38	2,418	2,632	3,142	3,142	0,311

Tabela S6 – Classes de peptídeos não-ribossômicos que contêm uma conexão ureia.

Composto (GenBank)	Organismo	Ureido linkage	Referências
Minosaminomicina	<i>Streptomyces</i> sp.	Leu-CO-Arg	(HAMADA et al., 1974)
SP-chimostatina	<i>Streptomyces libani</i>	Phe-CO-Arg	(OKA et al., 1979)
α -MAPI	<i>Streptomyces nigrescens</i>	Phe-CO-Arg	(WATANABE; FUKUHARA; MURAO, 1979)
strepina	<i>Streptomyces tanabeensis</i>	Arn-CO-Leu	(OGURA et al., 1985)
Mer-N5075A	<i>Streptomyces chromofuscus</i>	Phe-CO-Arg	(KANETO et al., 1993)
GE20372	<i>Streptomyces</i> sp.	Tyr-CO-Arg	(STEFANELLI et al., 1995)
mureidomicinas (DS999644.1)	<i>Streptomyces flavidovirens</i>	aa ₁ -CO- aa ₂ aa ₁ : m-Tyr, Phe aa ₂ : Met, MetSO, Leu, Ile	(ISONO et al., 1989; JIANG et al., 2015)
pacidamicinas (HM855229.1)	<i>Streptomyces coeruleorubidus</i>	aa ₁ -CO-Ala aa ₁ : m-Tyr, Trp, Phe	(CHEN et al., 1989; ZHANG et al., 2011; ZHANG; OSTASH; WALSH, 2010)
napsamicinas (HQ287563.1)	<i>Streptomyces</i> sp.	m-Tyr-CO-Met	(CHATTERJEE et al., 1994; KAYSSER et al., 2011)
antipains (LWBU01000384.1)	<i>Streptomyces albulus</i>	aa ₁ -CO-Arg aa ₁ : Phe, Tyr	(MAXSON et al., 2016)
muraimicinas	<i>Streptomyces</i> sp.	Leu-CO-Arg	(CUI et al., 2018)

Continua →

Continuação da Tabela S6

sansanmicinas	<i>Streptomyces</i> sp.	aa ₁ -CO- aa ₂ aa ₁ : m-Tyr, Trp aa ₂ : Met, MetSO, Phe, Leu	(JIANG et al., 2018; XIE et al., 2007, 2008; ZHANG et al., 2016)
ácidos ferintóicos	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Trp-CO-Lys	(WILLIAMS et al., 1996)
shizopeptinas	<i>Schizothrix</i> sp.	Ile-CO-Lys	(RESHEF; CARMELI, 2002)
brunsvicamidas	<i>Tychonema</i> sp.	Ile-CO-Lys	(MÜLLER et al., 2006)
pompanopeptinas	<i>Lyngbya confervoides</i>	Ile-CO-Lys	(MATTHEW et al., 2008)
anabaenopeptinas (GU174493.1, EF672686.1)	<i>Anabaena</i> spp.	aa ₁ -CO-Lys	(ELKOBI-PEER; CARMELI, 2015; ENTFELLNER et al., 2017; FUJII et al., 2000, 2002; GESNER-APTER; CARMELI, 2008; GRACH-POGREBINSKY; SEDMAK; CARMELI, 2003; HARADA et al., 1995; ITOU et al., 1999; KODANI et al., 1999; MURAKAMI et al., 2000; ROUHIAINEN et al., 2000, 2010; SHIN et al., 1997; SHISHIDO et al., 2017; ZAFRIR-ILAN; CARMELI, 2010)
	<i>Planktothrix</i> sp.	aa ₁ : Tyr, Ile, Phe, Arg, Trp	
	<i>Nostoc</i> sp.		
	<i>Mycrocystis</i> spp.		
	<i>Oscillatoria</i> spp.		
	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>		
	Unknown cianobacteria bloom		
oscillamidas	<i>Mycrocystis</i> sp.	aa ₁ -CO-Lys	(FUJII et al., 2000; GESNER-APTER; CARMELI, 2008; SANO et al., 2001; SANO; KAYA, 1995)
	<i>Oscillatoria agardhii</i>	aa ₁ : Tyr, Arg	
	<i>Planktothrix</i> spp.		

Continua →

Continuação da Tabela S6

siringolina (AJ548826.1, AJVWM01000074.1)	<i>Pseudomonas syringae</i>	aa ₁ -CO- aa ₁ aa ₁ : Leu, Ile	(AMREIN et al., 2004; DUDNIK; BIGLER; DUDLER, 2014; IMKER; WALSH; WUEST, 2009; RAMEL et al., 2009; WÄSPI et al., 1998)
	<i>Rhizobium</i> sp.		
namalidas	<i>Silicibacter sp.</i> <i>Nostoc</i> sp.	aa ₁ -CO-Lys aa ₁ : Leu, Ile, Phe	(CHERUKU et al., 2012; SHISHIDO et al., 2017)
lingbiaureidamida	<i>Lyngbya</i> sp.	Phe-CO-Lys	(ZI et al., 2012)
nostamidas	<i>Nostoc punctiforme</i>	Phe-CO-Lys	(DEHM et al., 2019)
konbamida	<i>Theonella</i> sp.	Leu-CO-Lys	(ISHIBASHI et al., 1994; KOBAYASHI et al., 1991a, 1991b)
keramamida		Phe-CO-Lys	
bromofenóis	<i>Rhodospira rubra</i>	Br-phenol-CO-Orn	(MA et al., 2006)

Tabela S7 – Produtos naturais bacterianos que contém resíduos Dha/Dhb.

Composto (BGC)	Organismo	Posição	Referências
microcistinas (AF183408.1, AJ441056.1, AY212249.1, KX891213.1)	<i>Microcystis aeruginosa</i>	aa1- aa2-aa3	(CHRISTIANSEN et al., 2003; HECK et al., 2018; HICKS et al., 2006; TILLET et al., 2000)
	<i>Anabaena</i> sp.		
	<i>Planktothrix agardhii</i>	aa1: D-Glu, D-Glu(OCH ₃)	
	<i>Fischerella</i> sp.	aa2: Dha, Ser, Dhb, Lan aa3: D-Ala, D-Ser, D-Leu	
FR901228 (EF210776.1)	<i>Chromobacterium violaceum</i>	D-Cys-Dhb-L-Val	(CHENG; YANG; MATTER, 2007)
nodularina (MF668122.1)	<i>Nostoc</i> sp.	D-Glu-Dhb-D-Asp	(GEHRINGER et al., 2012)
bogorol (KY810814.1)	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	Hmp-Dhb-aa3	(BARSBY et al., 2006; DEJONG et al., 2016)
		aa3: L-Val, L-Met, L-Met ^{SO}	
pantomicina	<i>Streptomyces</i> spp.	D-Ala-Dhb-D-Thr	(VILLADSEN et al., 2018)
pseudomicinas	<i>Pseudomonas syringae</i>	L-aThr-Dhb-L-Asp	(BALLIO et al., 1994)
fuscopeptinas	<i>Pseudomonas fuscovaginae</i>	FA-Dhb-D-Pro D-Val-Dhb-D-aThr L-Ala-Dha-Dha-L-Phe	(BALLIO et al., 1996)
siringomicinas (CP000075.1)	<i>Pseudomonas</i> spp.	L-Phe-Dhb-L-Asp(OH)	(SCHOLZ-SCHROEDER; SOULE; GROSS, 2003)

Continua →

Continuação da Tabela S7

siringopeptinas (AF286216.2)	<i>Pseudomonas</i> sp.	FA-Dhb-Pro Ala-Dhb-aThr Ala-Dhb-Ala	(GRGURINA et al., 2005; SCHOLZ-SCHROEDER; SOULE; GROSS, 2003)
siringoestatinas	<i>Pseudomonas</i> sp.	Thr-Dhb-Asp(OH)	(ISOGAI et al., 1990)
hassallidinas (KJ502174.1, LT546031.1)	<i>Anabaena</i> sp. <i>Planktothrix</i> <i>serta</i>	D-Tyr-Dhb-D-Gln	(PANCRAE et al., 2017; VESTOLA et al., 2014)
loihichelinas	<i>Halomonas</i> sp.	D-Orn(OH)-Dhb-L-Ser	(HOMANN et al., 2009)
tolaasinas (HE967327.1)	<i>Pseudomonas</i> spp.	FA-Dhb-Pro Val-Dhb-Thr	(SCHERLACH et al., 2013)
sessilina (JQ309920.1)	<i>Pseudomonas</i> sp.	Val-Dhb-Thr	(D'AES et al., 2014)
corpeptinas cormicinas	<i>Pseudomonas corrugata</i>	FA-Dhb-Pro Val-Dhb-Hse Ile-Dha-Ala Val-Dhb-Thr	(STRANO et al., 2015)
jessenipeptina	<i>Pseudomonas</i> sp.	FA-Dhb-D-Pro D-Leu-Dhb-D-aThr	(ARP et al., 2018)
puwaianaficinas (MH325199.1, MH325197.1)	<i>Anabaena</i> sp. <i>Cylindrospermum</i> <i>alatosporum</i>	Val-Dhb-aa ₁ -aa ₂ aa ₁ : Asn, Gln, Thr aa ₂ : Dhb, Thr, Val	(MAREŠ et al., 2019)

Tabela S8 – Peptídeos que contém o heterociclo tiazol em sua estrutura.

	Composto	Organismo (filó)	Classe biossintética	Referências
Pro-thz	ciclodidemnamida	<i>Didemnum mole</i>	-	(ARRAULT et al., 2002)
	ceratospongamida	<i>Ceratodictyon spongiosum</i>	-	(TAN et al., 2000)
	aeruginosamida	<i>Microcystis aeruginosa</i>	RiPP	(LAWTON; MORRIS; JASPARS, 1999)
	aestuaramidas	<i>Lyngbya aestuarii</i>	RiPP	(MCINTOSH et al., 2013)
	apramides	<i>Lyngbya majuscula</i>	-	(LUESCH et al., 2000)
Gly-thz	micromida	<i>Symploca</i> sp.	-	(WILLIAMS et al., 2004)
	colibactina	<i>Escherichia coli</i>	PKS-NRPS	(XUE et al., 2019)
	pagoamida	<i>Derbesia</i> sp.	-	(LI et al., 2020)
Ala-thz	guineamida	<i>Lyngbya majuscula</i>	-	(TAN; SITACHITTA; GERWICK, 2003)
	obianamida	<i>Lyngbya confervoides</i>	-	(WILLIAMS et al., 2002)
Ser-thz	trichamida	<i>Trichodesmium erythraeum</i>	RiPP	(SUDEK et al., 2006)
Val-thz	antalídeo	<i>Polyangium</i> sp.	PKS-NRPS	(TAUTZ et al., 2016)
Leu-thz	micrococcina	<i>Macrococcus caseolyticus</i>	RiPP	(BENNALLACK et al., 2014)
Ile-thz	goadsporina	<i>Streptomyces</i> sp.	RiPP	(ONAKA et al., 2005)
	microciclāmida	<i>Microcystis aeruginosa</i>	RiPP	(ZIEMERT et al., 2008)
Asn-thz	klebsazolicina	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	RiPP	(TRAVIN et al., 2018)

Continua →

Continuação da Tabela S8

Phe-thz	haligramida	<i>Haliclona nigra</i>	-	(RASHID et al., 2000)
	waiakeamida	<i>Ircina dendroides</i>	-	(MAU et al., 1996)
	patellamida	<i>Prochloron didemni</i>	RiPP	(SCHMIDT et al., 2005)
Thz-thz	bleomicina tallisomicina zorbamicina	<i>Streptomyces verticillus</i>	NRPS	(GALM et al., 2011)
Outros	bottromicina	<i>Streptomyces scabies</i>	RiPP	(SHIMAMURA et al., 2009)
	nocatiacina	<i>Nocardia sp.</i> e <i>Actinokineospora fastidiosa</i>	RiPP	(DING et al., 2010; WEI et al., 2011)
	thiopeptina	<i>Streptomyces tateyamensis</i>	RiPP	(SCHWALEN et al., 2018)
	thiostreptona	<i>Streptomyces laurentii</i>	RiPP	(KELLY; PAN; LI, 2009)
	nosiheptida	<i>Streptomyces</i> spp.	RiPP	(YU et al., 2009)
PK-thz	epotilona	<i>Sorangium sp.</i>	PKS-NRPS	(O'CONNOR; CHEN; WALSH, 2002)

Figura S1 – Resultado da análise por multigene blast, utilizando o NRPS-PKS BGC de *P. brasiliensis* Ab134 como *query*.

Figura S2 – Arquitetura dos domínios codificados pelo *ppp* BGC de *P. brasiliensis* Ab134 e BGC homólogos de *Pseudovibrio* spp. e *Pseudomonas* spp. (versão completa da Figura 5.9).

Gene	<i>pppA</i>			<i>pppB</i>			<i>pppC</i>	<i>pppD</i>		
Módulo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	A	P	C	A	P	C	A	P	C	A
	Y	✓	T	✓	X	✓	R	✓	P	✓
<i>Pseudovibrio brasiliensis</i> Ab134	Y	✓	T	✓	X	✓	R	✓	P	✓
<i>Pseudovibrio</i> sp. Alg231-02	Y	✓	T	✓	G	✓	R	✓	P	✓
<i>Pseudovibrio</i> sp. POLY-S9	Y	✓	T	✓	G	✓	R	✓	P	✓
<i>P. axinellae</i> Ad2	Y	✓	T	✓	G	✓	R	✓	P	✓
<i>P. axinellae</i> DSM24994	Y	✓	T	✓	G	✓	R	✓	P	✓
<i>Pseudovibrio</i> sp. W64	Y	✓	T	✓	G	✓	R	✓	P	✓
<i>Pseudovibrio</i> sp. W74	Y	✓	T	✓	G	✓	R	✓	P	✓
<i>Pseudovibrio</i> sp. WM33	Y	✓	T	✓	G	✓	R	✓	P	✓
<i>Pseudovibrio</i> sp. Ad5	Y	✓	T	✓	G	✓	R	✓	P	✓
<i>Pseudovibrio</i> sp. Ad13	Y	✓	T	✓	G	✓	R	✓	P	✓
<i>Pseudovibrio</i> sp. Ad14	Y	✓	T	✓	G	✓	R	✓	P	✓
<i>Pseudovibrio</i> sp. Ad26	X	✓	T	✓	G	✓	R	✓	P	✓
<i>Pseudovibrio</i> sp. Ad37	Y	✓	Y	✓	G	✓	R	✓	P	✓
<i>Pseudovibrio</i> sp. Ad46	Y	✓	T	✓	G	✓	R	✓	P	✓
<i>Pseudovibrio</i> sp. Tun.PSC04-5.14	Y	✓	T	✓	G	*	✓	R	✓	P
<i>P. denitrificans</i> DSM17465	X	✓	T	✓	X	✓	R	✓	P	✓
<i>P. denitrificans</i> JCM12308	X	✓	T	✓	X	✓	R	✓	P	✓
<i>Ps. fuscovaginae</i> LMG2158	X	✓	T	✓	T	✓	R	✓	P	✓
<i>Ps. asplenii</i> ATCC 23835	X	✓	T	✓	T	✓	R	✓	P	✓
<i>Ps. kribbensis</i> 46-2	-	-	-	-	-	R	✓	P	✓	C2
<i>Pseudomonas</i> sp. CCOS 191	-	-	-	-	-	R	✓	P	✓	C2
<i>Ps. entomophila</i> L48	-	-	-	-	-	R	✓	P	✓	C2
<i>Ps. fluorescens</i> NEP1	-	-	-	-	-	R	✓	P	✓	C2
<i>Pseudomonas</i> sp. DR 5-09	-	-	-	-	-	R	✓	P	✓	C2
<i>Ps. moraviensis</i> BS3668	-	-	-	-	-	R	✓	P	✓	C2
<i>Ps. reinekei</i> BS3776	-	-	-	-	-	R	✓	P	✓	C2
<i>Ps. syringae</i> pv. <i>syringae</i> CFBP4215	-	-	-	-	-	R	✓	P	✓	C2
<i>Ps. syringae</i> 31R1	-	-	-	-	-	R	✓	P	✓	C2
<i>Ps. viridiflava</i> CFBP1590	-	-	-	-	-	R	✓	P	✓	C2
<i>Ps. savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i> 1448A	-	-	-	-	-	R	✓	P	✓	C2
<i>Ps. amygdali</i> pv. <i>lachrymans</i> NM002	-	-	-	-	-	R	✓	P	✓	C2
<i>Ps. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> NCPB3335	-	-	-	-	-	R	✓	P	✓	C2
<i>Ps. syringae</i> pv. <i>syringae</i> SM	-	-	-	-	-	R	✓	P	✓	C2
<i>Ps. syringae</i> pv. <i>syringae</i> CFB2118	-	-	-	-	-	R	✓	P	✓	C2
<i>Ps. syringae</i> pv. <i>cerasicola</i> CFB6109	-	-	-	-	-	R	✓	P	✓	C2
<i>Ps. syringae</i> pv. <i>lapsa</i> ATCC 10859	-	-	-	-	-	R	✓	P	✓	C2
<i>Ps. syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a	-	-	-	-	-	R	✓	P	✓	C2
<i>Ps. syringae</i> pv. <i>atrofacien</i> LMG5095	-	-	-	-	-	R	✓	P	✓	C2
<i>Ps. syringae</i> pv. <i>syringae</i> B64	-	-	-	-	-	R	✓	P	✓	C2
<i>Ps. syringae</i> pv. <i>syringae</i> HS191	-	-	-	-	-	R	✓	P	✓	✓
<i>Ps. syringae</i> pv. <i>syringae</i> B301D	-	-	-	-	-	R	✓	P	✓	C2
<i>Ps. cerasi</i> PL963	-	-	-	-	-	R	✓	P	✓	C2
<i>Ps. syringae</i> pv. <i>syringae</i> Pss9097	-	-	-	-	-	R	✓	P	✓	C2
<i>Ps. amygdali</i> pv. <i>morsprunorum</i> R15244	-	-	-	-	-	R	✓	P	✓	C2

Figura S3 – Fotos comparando-se o fenótipo de *swarming* (A) e *swimming* (B) de *P. brasiliensis* Ab134 WT e os mutantes *pppA* e *pppD* à 30 °C.

Figura S4 – Espectro de RMN de ^1H do composto **1**, fração F2B67D3 (900 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ + TFA).

Figura S5 – Espectro de RMN de ^{13}C DEPTQ do composto **1**, fração F2B67D3 (226 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ + TFA).

Figura S6 – Espectro de RMN HSQC do composto **1**, fração F2B67D3 (226 MHz:900 MHz, DMSO- d_6 + TFA).

Figura S7 – Espectro de RMN de HSQC-TOCSY do composto **1**, fração F2B67D3 (226 MHz:900 MHz, DMSO- d_6 + TFA).

Figura S8 – Espectro de RMN COSY do composto **1**, fração F2B67D3 (900 MHz, DMSO- d_6 + TFA). Figura S9 – Espectro de RMN de HMBC do composto **1**, fração F2B67D3 (226 MHz:900 MHz, DMSO- d_6 + TFA).

Figura S10 – Espectro de RMN de ROESY do composto **1**, fração F2B67D3 (900 MHz, DMSO- d_6 + TFA).

Figura S11 – Espectro de RMN de ^{15}N do composto **1**, fração F2B67D3 (91 MHz:900 MHz, DMSO- d_6 + TFA).

Figura S12 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 1 + L-FDTA, L-Tyr + L-FDTA e L-Tyr + D-FDTA, respectivamente.

Figura S13 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 1 + L-FDTA, L-Ala + L-FDTA e L-Ala + D-FDTA, respectivamente.

Figura S14 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 1 + L-FDTA, L-Arg + L-FDTA e L-Arg + D-FDTA, respectivamente.

Figura S15 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 1 + L-FDTA, L-Pro + L-FDTA e L-Pro + D-FDTA, respectivamente.

Figura S16 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 1 + L-FDTA, L-Glu + L-FDTA e L-Glu + D-FDTA, respectivamente.

Figura S17 – Espectro de RMN de ^1H do composto **2**, frações F2B67D1/FD2B3D1 (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ + TFA).

Figura S18 – Espectro de RMN de ^{13}C do composto **2**, frações F2B67D1/FD2B3D1 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ + TFA).

Figura S19 – Espectro de RMN de HSQC do composto **2**, frações F2B67D1/FD2B3D1 (150 MHz:600 MHz, DMSO- d_6 + TFA).

Figura S20 – Espectro de RMN de COSY do composto **2**, frações F2B67D1/FD2B3D1 (600 MHz, DMSO- d_6 + TFA).

Figura S21 – Espectro de RMN de HSQC-TOCSY do composto **2**, frações F2B67D1/FD2B3D1 (150 MHz:600 MHz, DMSO- d_6 + TFA).

Figura S22 – Espectro de RMN de HMBC do composto **2**, frações F2B67D1/FD2B3D1 (150 MHz:600 MHz, DMSO- d_6 + TFA).

Figura S23 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 2 + L-FDTA, L-Tyr + L-FDTA e L-Tyr + D-FDTA, respectivamente.

Figura S24 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 2 + L-FDTA, L-Ala + L-FDTA e L-Ala + D-FDTA, respectivamente.

Figura S25 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 2 + L-FDTA, L-Arg + L-FDTA e L-Arg + D-FDTA, respectivamente.

Figura S26 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 2 + L-FDTA, L-Pro + L-FDTA e L-Pro + D-FDTA, respectivamente.

Figura S27 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações **2** + L-FDTA, L-Glu + L-FDTA e L-Glu + D-FDTA, respectivamente.

Figura S28 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações **3** + L-FDTA, **4** + L-FDTA e Gly + D-FDTA, respectivamente.

Figura S29 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações **3** + L-FDTA, L-Tyr + L-FDTA e L-Tyr + D-FDTA, respectivamente.

Figura S30 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações **3** + L-FDTA, L-Arg + L-FDTA e L-Arg + D-FDTA, respectivamente.

Figura S31 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações **3** + L-FDTA, L-Pro + L-FDTA e L-Pro + D-FDTA, respectivamente.

Figura S32 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações **3** + L-FDTA, L-Glu + L-FDTA e L-Glu + D-FDTA, respectivamente.

Figura S33 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 4 + L-FDTA, L-Tyr + L-FDTA e L-Tyr + D-FDTA, respectivamente.

Figura S34 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 4 + L-FDTA, L-Arg + L-FDTA e L-Arg + D-FDTA, respectivamente.

Figura S35 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 4 + L-FDTA, L-Pro + L-FDTA e L-Pro + D-FDTA, respectivamente.

Figura S36 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 4 + L-FDTA, L-Glu + L-FDTA e L-Glu + D-FDTA, respectivamente.

Figura S37 – Espectro de RMN de ^1H da fração C23C1B (7), 600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ + TFA.

Figura S38 – Espectro de RMN de ^{13}C da fração C23C1B (7), 150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ + TFA.

Figura S39 – Espectro de RMN de HSQC da fração C23C1B (7), 150 MHz:600 MHz, DMSO- d_6 + TFA.

Figura S40 – Espectro de RMN de HSQC-TOCSY da fração C23C1B (7), 150 MHz:600 MHz, DMSO- d_6 + TFA.

Figura S41 – Espectro de RMN de COSY da fração C23C1B (7), 600 MHz, DMSO- d_6 + TFA. Figura S42 – Espectro de RMN de HMBC da fração C23C1B (7), 150 MHz:600 MHz, DMSO- d_6 + TFA.

Figura S43 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 7 + L-FDTA, L-Tyr + L-FDTA e L-Tyr + D-FDTA, respectivamente.

Figura S44 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 7 + L-FDTA, L-Ala + L-FDTA e L-Ala + D-FDTA, respectivamente.

Figura S45 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 7 + L-FDTA, L-Arg + L-FDTA e L-Arg + D-FDTA, respectivamente.

Figura S46 - Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 7 + L-FDTA, L-Pro + L-FDTA e L-Pro + D-FDTA, respectivamente.

Figura S47 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 7 + L-FDTA, L-Glu + L-FDTA e L-Glu + D-FDTA, respectivamente.

Figura S48 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações 7 + L-FDTA, L-Val + L-FDTA e L-Val + D-FDTA, respectivamente.

Figura S49 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações **8/9** + L-FDTA, L-Ile + L-FDTA e L-Ile + D-FDTA, respectivamente.

Figura S50 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações **8/9** + L-FDTA, L-Leu + L-FDTA e L-Leu + D-FDTA, respectivamente.

Figura S51 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações **8/9** + L-FDTA, L-Ile + L-FDTA e L-Leu + L-FDTA, respectivamente.

Figura S52 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações **8/9** + L-FDTA, L-Tyr + L-FDTA e L-Tyr + D-FDTA, respectivamente.

Figura S53 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações **8/9** + L-FDTA, L-Ala + L-FDTA e L-Ala + D-FDTA, respectivamente.

Figura S54 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações **8/9** + L-FDTA, L-Arg + L-FDTA e L-Arg + D-FDTA, respectivamente.

Figura S55 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações **8/9** + L-FDTA, L-Pro + L-FDTA e L-Pro + D-FDTA, respectivamente.

Figura S56 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações **8/9** + L-FDTA, L-Glu + L-FDTA e L-Glu + D-FDTA, respectivamente.

Figura S57 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações **10** + L-FDTA e L-Gly + D-FDTA, respectivamente.

Figura S58 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações **10** + L-FDTA, L-Tyr + L-FDTA e L-Tyr + D-FDTA, respectivamente.

Figura S59 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações **10** + L-FDTA, L-Arg + L-FDTA e L-Arg + D-FDTA, respectivamente.

Figura S60 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações **10** + L-FDTA, L-Pro + L-FDTA e L-Pro + D-FDTA, respectivamente.

Figura S61 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações **10** + L-FDTA, L-Glu + L-FDTA e L-Glu + D-FDTA, respectivamente.

Figura S62 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações **10** + L-FDTA, L-Val + L-FDTA e L-Val + D-FDTA, respectivamente.

Figura S63 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações **11/12** + L-FDTA, L-Tyr + L-FDTA e L-Tyr + D-FDTA, respectivamente.

Figura S64 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações **11/12** + L-FDTA, L-Ala + L-FDTA e L-Ala + D-FDTA, respectivamente.

Figura S65 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações **11/12** + L-FDTA, L-Arg + L-FDTA e L-Arg + D-FDTA, respectivamente.

Figura S66 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações **11/12** + L-FDTA, L-Pro + L-FDTA e L-Pro + D-FDTA, respectivamente.

Figura S67 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações **11/12** + L-FDTA, L-Glu + L-FDTA e L-Glu + D-FDTA, respectivamente.

Figura S68 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações **11/12** + L-FDTA, L-Ile + L-FDTA e L-Ile + D-FDTA, respectivamente.

Figura S69 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações **11/12** + L-FDTA, L-Leu + L-FDTA e L-Leu + D-FDTA, respectivamente.

Figura S70 – Comparação de cromatogramas obtidos por análises de UPLC-QTOF-MS das reações **11/12** + L-FDTA, L-Ile + L-FDTA e L-Leu + L-FDTA, respectivamente.

Referências Bibliográficas

- AMREIN, H.; MAKART, S.; GRANADO, J.; SHAKYA, R.; SCHNEIDER-POKORNY, J.; DUDLER, R. Functional analysis of genes involved in the synthesis of syringolin A by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B301D-R. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 17, n. 1, p. 90–97, 2004.
- ARP, J.; GÖTZE, S.; MUKHERJI, R.; MATTERN, D. J.; GARCÍA-ALTARES, M.; KLAPPER, M. Synergistic activity of cosecreted natural products from amoebae-associated bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 15, p. 3758–3763, 2018.
- ARRAULT, A.; WITCZAK-LEGRAND, A.; GONZALEZ, P.; BONTEMPS-SUBIELOS, N.; BANAIGS, B. Structure and total synthesis of cyclodidemnamide B, a cycloheptapeptide from the ascidian *Didemnum molle*. **Tetrahedron Letters**, v. 43, n. 22, p. 4041–4044, 2002.
- BALLIO, A.; BOSSA, F.; CAMONI, L.; GIORGIO, D. DI; FLAMAND, M. C.; MARAITE, H.; NITTI, G.; PUCCI, P.; SCALONI, A. Structure of fuscopeptins, phytotoxic metabolites of *Pseudomonas fuscovaginae*. **FEBS Letters**, v. 381, n. 3, p. 213–216, 1996.
- BALLIO, A.; BOSSA, F.; GIORGIO, D. DI; FERRANTI, P.; PACI, M.; PUCCI, P.; SCALONI, A.; SEGRE, A.; STROBEL, G. A. Novel bioactive lipodepsipeptides from *Pseudomonas syringae*: the pseudomycins. **FEBS Letters**, v. 355, n. 1, p. 96–100, 1994.
- BARSBY, T.; WARABI, K.; SØRENSEN, D.; ZIMMERMAN, W. T.; KELLY, M. T.; ANDERSEN, R. J. The bogorol family of antibiotics: Template-based structure elucidation and a new approach to positioning enantiomeric pairs of amino acids. **Journal of Organic Chemistry**, v. 71, n. 16, p. 6031–6037, 2006.
- BENNALLACK, P. R.; BURT, S. R.; HEDER, M. J.; ROBISON, R. A.; GRIFFITTS, J. S. Characterization of a novel plasmid-borne thiopeptide gene cluster in *Staphylococcus epidermidis* strain 115. **Journal of Bacteriology**, v. 196, n. 24, p. 4344–4350, 2014.
- CHATTERJEE, S.; NADKARNI, S. R.; VIJAYAKUMAR, E. K. S.; PATEL, M. V.; GANGULI, B. N.; FEHLHABER, H. W.; VERTESY, L. Napsamycins, new *Pseudomonas* active antibiotics of the mureidomycin family from *Streptomyces* sp. hil Y-82, 11372. **The Journal of Antibiotics**, v. 47, n. 5, p. 595–598, 1994.
- CHEN, R. H.; BUKO, A. M.; WHITTERN, D. N.; MCALPINE, J. B. Pacidamycins, a novel series of antibiotics with anti-*Pseudomonas aeruginosa* activity. II. Isolation and structural elucidation. **The Journal of antibiotics**, v. 42, n. 4, p. 512–520, 1989.
- CHENG, Y. Q.; YANG, M.; MATTER, A. M. Characterization of a gene cluster responsible for the biosynthesis of anticancer agent FK228 in *Chromobacterium violaceum* No. 968. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 11, p. 3460–3469, 2007.
- CHERUKU, P.; PLAZA, A.; LAURO, G.; KEFFER, J.; LLOYD, J. R.; BIFULCO, G.; BEWLEY, C. A. Discovery and synthesis of namalide reveals a new anabaenopeptin scaffold and peptidase inhibitor. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 2, p. 735–

742, 2012.

CHRISTIANSEN, G.; FASTNER, J.; ERHARD, M.; BÖRNER, T.; DITTMANN, E. Microcystin biosynthesis in *Planktothrix*: genes, evolution, and manipulation. **Journal of bacteriology**, v. 185, n. 2, p. 564–572, 2003.

CUI, Z.; WANG, X.; KOPPERMANN, S.; THORSON, J. S.; DUCHO, C.; LANEN, S. G. VAN. Antibacterial muraymycins from mutant strains of *Streptomyces* sp. NRRL 30471. **Journal of Natural Products**, v. 81, n. 4, p. 942–948, 2018.

D'AES, J.; KIEU, N. P.; LÉCLÈRE, V.; TOKARSKI, C.; OLORUNLEKE, F. E.; MAEYER, K. DE; JACQUES, P.; HÖFTE, M.; ONGENA, M. To settle or to move? The interplay between two classes of cyclic lipopeptides in the biocontrol strain *Pseudomonas* CMR12a. **Environmental microbiology**, v. 16, n. 7, p. 2282–2300, 2014.

DEHM, D.; KRUMBHOLZ, J.; BAUNACH, M.; WIEBACH, V.; HINRICHS, K.; GULJAMOW, A.; TABUCHI, T.; JENKE-KODAMA, H.; SÜSSMUTH, R. D.; DITTMANN, E. Unlocking the spatial control of secondary metabolism uncovers hidden natural product diversity in *Nostoc punctiforme*. **ACS Chemical Biology**, v. 14, n. 6, p. 1271–1279, 2019.

DEJONG, C. A.; CHEN, G. M.; LI, H.; JOHNSTON, C. W.; EDWARDS, M. R.; REES, P. N.; SKINNIDER, M. A.; WEBSTER, A. L. H.; MAGARVEY, N. A. Polyketide and nonribosomal peptide retro-biosynthesis and global gene cluster matching. **Nature Chemical Biology**, v. 12, n. 12, p. 1007–1014, 2016.

DING, Y.; YU, Y.; PAN, H.; GUO, H.; LI, Y.; LIU, W. Moving posttranslational modifications forward to biosynthesize the glycosylated thiopeptide nocathiacin I in *Nocardia* sp. ATCC202099. **Molecular bioSystems**, v. 6, n. 7, p. 1180–1185, 2010.

DUDNIK, A.; BIGLER, L.; DUDLER, R. Production of proteasome inhibitor syringolin a by the endophyte *Rhizobium* sp. strain AP16. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 12, p. 3741–3748, 2014.

ELKOBI-PEER, S.; CARMELI, S. New prenylated aeruginosin, microphycin, anabaenopeptin and micropeptin analogues from a *Microcystis* bloom material collected in Kibbutz Kfar Blum, Israel. **Marine Drugs**, v. 13, n. 4, p. 2347–2375, 2015.

ENTFELLNER, E.; FREI, M.; CHRISTIANSEN, G.; DENG, L.; BLOM, J.; KURMAYER, R. Evolution of anabaenopeptin peptide structural variability in the cyanobacterium *Planktothrix*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.

FUJII, K.; SIVONEN, K.; NAGANAWA, E.; HARADA, K. ICHI. Non-toxic peptides from toxic cyanobacteria, *Oscillatoria agardhii*. **Tetrahedron**, v. 56, n. 5, p. 725–733, 2000.

FUJII, K.; SIVONEN, K.; NAKANO, T.; HARADA, K. I. Structural elucidation of cyanobacterial peptides encoded by peptide synthetase gene in *Anabaena* species. **Tetrahedron**, v. 58, n. 34, p. 6863–6871, 2002.

GALM, U.; WENDT-PIENKOWSKI, E.; WANG, L.; HUANG, S.-X.; UNSIN, C.; TAO, M.; COUGHLIN, J. M.; SHEN, B. Comparative analysis of the biosynthetic gene clusters and pathways for three structurally related antitumor antibiotics: bleomycin, tallysomycin, and zorbamycin. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 3, p. 526–536, 2011.

GEHRINGER, M. M.; ADLER, L.; ROBERTS, A. A.; MOFFITT, M. C.; MIHALI, T. K.; MILLS, T. J. T.; FIEKER, C.; NEILAN, B. A. Nodularin, a cyanobacterial toxin, is synthesized in planta by symbiotic *Nostoc* sp. **ISME Journal**, v. 6, n. 10, p. 1834–1847, 2012.

GESNER-APTER, S.; CARMELI, S. Three novel metabolites from a bloom of the cyanobacterium *Microcystis* sp. **Tetrahedron**, v. 64, n. 28, p. 6628–6634, 2008.

GRACH-POGREBINSKY, O.; SEDMAK, B.; CARMELI, S. Protease inhibitors from a Slovenian Lake Bled toxic waterbloom of the cyanobacterium *Planktothrix rubescens*. **Tetrahedron**, v. 59, n. 42, p. 8329–8336, 2003.

GRGURINA, I.; BENSACI, M.; POCSFALVI, G.; MANNINA, L.; CRUCIANI, O.; FIORE, A.; FOGLIANO, V.; SORENSEN, K. N.; TAKEMOTO, J. Y. Novel cyclic lipodepsipeptide from *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* strain 508 and syringopeptin antimicrobial activities. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 12, p. 5037–5045, 2005.

HAMADA, M.; KONDO, S.; YOKOYAMA, T.; MIURA, K.; IINUMA, K.; YAMAMOTO, H.; MAEDA, K.; TAKEUCHI, T.; UMEZAWA, H. Minosaminomycin, a new antibiotic containing myo-inosamine. **The Journal of Antibiotics**, v. 27, n. 1, p. 81–83, 1974.

HARADA, K. ICHI; FUJII, K.; SHIMADA, T.; SUZUKI, M.; SANO, H.; ADACHI, K.; CARMICHAEL, W. W. Two cyclic peptides, anabaenopeptins, a third group of bioactive compounds from the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17. **Tetrahedron Letters**, v. 36, n. 9, p. 1511–1514, 1995.

HECK, K.; ALVARENGA, D. O.; SHISHIDO, T. K.; VARANI, A. M.; DÖRR, F. A.; PINTO, E.; ROUHIAINEN, L.; JOKELA, J.; SIVONEN, K.; FIORE, M. F. Biosynthesis of microcystin hepatotoxins in the cyanobacterial genus *Fischerella*. **Toxicon**, v. 141, p. 43–50, 2018.

HICKS, L. M.; MOFFITT, M. C.; BEER, L. L.; MOORE, B. S.; KELLEHER, N. L. Structural characterization of *in vitro* and *in vivo* intermediates on the loading module of microcystin synthetase. **ACS Chemical biology**, v. 1, n. 2, p. 93–102, 2006.

HOMANN, V. V.; SANDY, M.; TINCUI, J. A.; TEMPLETON, A. S.; TEBO, B. M.; BUTLER, A. Loihichelins A-F, a suite of amphiphilic siderophores produced by the marine bacterium *Halomonas* LOB-5. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 5, p. 884–888, 2009.

IMKER, H. J.; WALSH, C. T.; WUEST, W. M. SylC catalyzes ureido-bond formation during biosynthesis of the proteasome inhibitor syringolin A. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 51, p. 18263–18265, 2009.

ISHIBASHI, M.; LI, Y.; SATO, M.; KOBAYASHI, J. Stereochemistry of the modified tryptophan residues contained in konbamide and keramamide isolated from marine sponges of the genus *Theonella*. **Natural Product Letters**, v. 4, n. 4, p. 293–296, 1994.

ISOGAI, A.; FUKUCHI, N.; YAMASHITA, S.; SUYAMA, K.; SUZUKI, A. Structures of syringostatins A and B, novel phytotoxins produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolated from lilac blights. **Tetrahedron Letters**, v. 31, n. 5, p. 695–698, 1990.

ISONO, F.; INUKAI, M.; TAKAHASHI, S.; HANEISHI, T.; KINOSHITA, T.; KUWANO, H. Mureidomycins A-D, novel peptidylnucleoside antibiotics with spheroplast forming

activity. II. Structural elucidation. **The Journal of Antibiotics**, v. 42, n. 5, p. 667–673, 1989.

ITOU, Y.; SUZUKI, S.; ISHIDA, K.; MURAKAMI, M. Anabaenopeptins G and H, potent carboxypeptidase A inhibitors from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii* (NIES-595). **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 9, n. 9, p. 1243–1246, 1999.

JIANG, L.; WANG, L.; ZHANG, J.; LIU, H.; HONG, B.; TAN, H.; NIU, G. Identification of novel mureidomycin analogues via rational activation of a cryptic gene cluster in *Streptomyces roseosporus* NRRL 15998. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–13, 2015.

JIANG, Z. B.; REN, W. C.; SHI, Y. Y.; LI, X. X.; LEI, X.; FAN, J. H.; ZHANG, C.; GU, R. J.; WANG, L. F.; XIE, Y. Y.; HONG, B. Structure-based manual screening and automatic networking for systematically exploring sansanmycin analogues using high performance liquid chromatography tandem mass spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 158, p. 94–105, 2018.

KANETO, R.; CHIBA, H.; DOBASHI, K.; KOJIMA, I.; SAKAI, K.; SHIBAMOTO, N.; NISHIDA, H.; OKAMOTO, R.; AKAGAWA, H.; MIZUNO, S. Mer-N5075A, a potential HIV-1 protease inhibitor, produced by *Streptomyces chromofuscus*. **The Journal of Antibiotics**, v. 46, n. 10, p. 1622–1624, 1993.

KAYSSER, L.; TANG, X.; WEMAKOR, E.; SEDDING, K.; HENNIG, S.; SIEBENBERG, S.; GUST, B. Identification of a napsamycin biosynthesis gene cluster by genome mining. **ChemBioChem**, v. 12, n. 3, p. 477–487, 2011.

KELLY, W. L.; PAN, L.; LI, C. Thiostrepton biosynthesis: prototype for a new family of bacteriocins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 12, p. 4327–4334, 2009.

KOBAYASHI, J.; SATO, M.; ISHIBASHI, M.; SHIGEMORI, H.; NAKAMURA, T.; OHIZUMI, Y. Keramamide A, a novel peptide from the okinawan marine sponge *Theonella* sp. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, n. 10, p. 2609–2611, 1991.

KOBAYASHI, J.; SATO, M.; MURAYAMA, T.; ISHIBASHI, M.; WÄLCHI, M. R.; KANAI, M.; SHOJI, J.; OHIZUMI, Y. Konbamide, a novel peptide with calmodulin antagonistic activity from the *Okinawan* marine sponge *Theonella* sp. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, n. 15, p. 1050–1052, 1991.

KODANI, S.; SUZUKI, S.; ISHIDA, K.; MURAKAMI, M. Five new cyanobacterial peptides from water bloom materials of lake Teganuma (Japan). **FEMS Microbiology Letters**, v. 178, n. 2, p. 343–348, 1999.

LAWTON, L. A.; MORRIS, L. A.; JASPARS, M. A bioactive modified peptide, aeruginosamide, isolated from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 64, n. 14, p. 5329–5332, 1999.

LI, Y.; YU, H.; ZHANG, Y.; LIAO, T.; GLUKHOV, E.; PIERCE, M. L.; ZHANG, C.; KIM, H.; MAO, H. H.; FANG, F.; COTTRELL, G. W.; MURRAY, T. F.; GERWICK, L.; GUAN, H.; GERWICK, W. H. Pagoamide A, a cyclic depsipeptide isolated from a cultured marine chlorophyte, *Derbesia* sp., using MS/MS-based molecular networking. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 617–625, 2020.

LUESCH, H.; YOSHIDA, W. Y.; MOORE, R. E.; PAUL, V. J. Apramides A–G, novel lipopeptides from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. **Journal of Natural**

Products, v. 63, n. 8, p. 1106–1112, 2000.

MA, M.; ZHAO, J.; WANG, S.; LI, S.; YANG, Y.; SHI, J.; FAN, X.; HE, L. Bromophenols coupled with methyl γ -ureidobutyrate and bromophenol sulfates from the red alga *Rhodomela confervoides*. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 2, p. 206–210, 2006.

MAREŠ, J. *et al.* Alternative biosynthetic starter units enhance the structural diversity of cyanobacterial lipopeptides. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 85, n. 4, p. 1–17, 2019.

MATTHEW, S.; ROSS, C.; PAUL, V. J.; LUESCH, H. Pompanopeptins A and B, new cyclic peptides from the marine cyanobacterium *Lyngbya confervoides*. **Tetrahedron**, v. 64, n. 18, p. 4081–4089, 2008.

MAU, C. M. S.; NAKAO, Y.; YOSHIDA, W. Y.; SCHEUER, P. J.; KELLY-BORGES, M. Waiakeamide, a cyclic hexapeptide from the sponge *Ircinia dendroides*. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 61, n. 18, p. 6302–6304, 1996.

MAXSON, T.; TIETZ, J. I.; HUDSON, G. A.; GUO, X. R.; TAI, H. C.; MITCHELL, D. A. Targeting reactive carbonyls for identifying natural products and their biosynthetic origins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 138, n. 46, p. 15157–15166, 2016.

MCINTOSH, J. A.; LIN, Z.; TIANERO, M. D. B.; SCHMIDT, E. W. Aestuaramides, a natural library of cyanobactin cyclic peptides resulting from isoprene-derived Claisen rearrangements. **ACS Chemical Biology**, v. 8, n. 5, p. 877–883, 2013.

MÜLLER, D.; KRICK, A.; KEHRAUS, S.; MEHNER, C.; HART, M.; KÜPPER, F. C.; SAXENA, K.; PRINZ, H.; SCHWALBE, H.; JANNING, P.; WALDMANN, H.; KÖNIG, G. M. Brunsvicamides A-C: sponge-related cyanobacterial peptides with *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase inhibitory activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 16, p. 4871–4878, 2006.

MURAKAMI, M.; SUZUKI, S.; ITOU, Y.; KODANI, S.; ISHIDA, K. New anabaenopeptins, carboxypeptidase-A inhibitors from the cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 9, p. 1280–1282, 2000.

O'CONNOR, S. E.; CHEN, H.; WALSH, C. T. Enzymatic assembly of epothilones: the EpoC subunit and reconstitution of the EpoA-ACP/B/C polyketide and nonribosomal peptide interfaces. **Biochemistry**, v. 41, n. 17, p. 5685–5694, 2002.

OGURA, K.; MAEDA, M.; NAGAI, M.; TANAKA, T.; NOMOTO, K.; MURACHI, T. Purification and structure of a novel cysteine proteinase inhibitor, Strepin p-1. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 49, n. 3, p. 799–805, 1985.

OKA, S.; SUZUKI, H.; HIRATA, Y.; TANABE, O. Protease inhibitors produced by *Streptomyces libani*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 43, n. 4, p. 691–696, 1979.

ONAKA, H.; NAKAHO, M.; HAYASHI, K.; IGARASHI, Y.; FURUMAI, T. Cloning and characterization of the goadsporin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces* sp. TP-A0584. **Microbiology**, v. 151, n. Pt 12, p. 3923–3933, 2005.

PANCRACE, C.; JOKELA, J.; SASSOON, N.; GANNEAU, C.; DESNOS-OLLIVIER, M.; WAHLSTEN, M.; HUMISTO, A.; CALTEAU, A.; BAY, S.; FEWER, D. P.; SIVONEN,

K.; GUGGER, M. Rearranged biosynthetic gene cluster and synthesis of hassallidin e in *Planktothrix sarta* PCC 8927. **ACS Chemical Biology**, v. 12, n. 7, p. 1796–1804, 2017.

RAMEL, C.; TOBLER, M.; MEYER, M.; BIGLER, L.; EBERT, M. O.; SCHELLENBERG, B.; DUDLER, R. Biosynthesis of the proteasome inhibitor syringolin A: The ureido group joining two amino acids originates from bicarbonate. **BMC Biochemistry**, v. 10, n. 1, p. 1–9, 2009.

RASHID, M. A.; GUSTAFSON, K. R.; BOSWELL, J. L.; BOYD, M. R. Haligramides A and B, two new cytotoxic hexapeptides from the marine sponge *Haliclona nigra*. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 956–959, 2000.

RESHEF, V.; CARMELI, S. Schizopeptin 791, a new anabeanopeptin-like cyclic peptide from the cyanobacterium *Schizothrix* sp. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 8, p. 1187–1189, 2002.

ROUHIAINEN, L.; JOKELA, J.; FEWER, D. P.; URMANN, M.; SIVONEN, K. Two alternative starter modules for the non-ribosomal biosynthesis of specific anabaenopeptin variants in *Anabaena* (Cyanobacteria). **Chemistry and Biology**, v. 17, n. 3, p. 265–273, 2010.

ROUHIAINEN, L.; PAULIN, L.; SUOMALAINEN, S.; HYYTIÄINEN, H.; BUIKEMA, W.; HASSELKORN, R.; SIVONEN, K. Genes encoding synthetases of cyclic depsipeptides, anabaenopeptilides, in *Anabaena* strain 90. **Molecular Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 156–167, 2000.

SANO, T.; KAYA, K. Oscillamide Y, a chymotrypsin inhibitor from toxic *Oscillatoria agardhii*. **Tetrahedron Letters**, v. 36, n. 33, p. 5933–5936, 1995.

SANO, T.; USUI, T.; UEDA, K.; OSADA, H.; KAYA, K. Isolation of new protein phosphatase inhibitors from two cyanobacteria species, *Planktothrix* spp. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 8, p. 1052–1055, 2001.

SCHERLACH, K.; LACKNER, G.; GRAUPNER, K.; PIDOT, S.; BRETSCHNEIDER, T.; HERTWECK, C. Biosynthesis and mass spectrometric imaging of tolaasin, the virulence factor of brown blotch mushroom disease. **ChemBioChem**, v. 14, n. 18, p. 2439–2443, 2013.

SCHMIDT, E. W.; NELSON, J. T.; RASKO, D. A.; SUDEK, S.; EISEN, J. A.; HAYGOOD, M. G.; RAVEL, J. Patellamide A and C biosynthesis by a microcin-like pathway in *Prochloron didemni*, the cyanobacterial symbiont of *Lissoclinum patella*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 20, p. 7315–7320, 2005.

SCHOLZ-SCHROEDER, B. K.; SOULE, J. D.; GROSS, D. C. The sypA, sypS, and sypC synthetase genes encode twenty-two modules involved in the nonribosomal peptide synthesis of syringopeptin by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B301D. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 16, n. 4, p. 271–280, 2003.

SCHWALEN, C. J.; HUDSON, G. A.; KILLE, B.; MITCHELL, D. A. Bioinformatic expansion and discovery of thiopeptide antibiotics. **Journal of the American Chemical Society**, v. 140, n. 30, p. 9494–9501, 2018.

SHIMAMURA, H.; GOUDA, H.; NAGAI, K.; HIROSE, T.; ICHIOKA, M.; FURUYA, Y.; KOBAYASHI, Y.; HIRONO, S.; SUNAZUKA, T.; ŌMURA, S. Structure determination

and total synthesis of bottromycin A2: a potent antibiotic against MRSA and VRE. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 48, n. 5, p. 914–917, 2009.

SHIN, H. J.; MATSUDA, H.; MURAKAMI, M.; YAMAGUCHI, K. Anabaenopeptins E and F, two new cyclic peptides from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii* (NIES-204). **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 2, p. 139–141, 1997.

SHISHIDO, T. K.; JOKELA, J.; FEWER, D. P.; WAHLSTEN, M.; FIORE, M. F.; SIVONEN, K. Simultaneous production of anabaenopeptins and namalides by the cyanobacterium *Nostoc* sp. CENA543. **ACS Chemical Biology**, v. 12, n. 11, p. 2746–2755, 2017.

STEFANELLI, S.; CAVALETTI, L.; SARUBBI, E.; RAGG, E.; COLOMBO, L.; SELVA, E. GE20372 factor A and B. New HIV-1 protease inhibitors, produced by *Streptomyces* sp. ATCC 55925. **The Journal of antibiotics**, v. 48, n. 4, p. 332–334, 1995.

STRANO, C. P.; BELLA, P.; LICCIARDELLO, G.; FIORE, A.; PIERO, A. R. LO; FOGLIANO, V.; VENTURI, V.; CATARA, V. *Pseudomonas corrugata* crpCDE is part of the cyclic lipopeptide corpeptin biosynthetic gene cluster and is involved in bacterial virulence in tomato and in hypersensitive response in *Nicotiana benthamiana*. **Molecular Plant Pathology**, v. 16, n. 5, p. 495–506, 2015.

SUDEK, S.; HAYGOOD, M. G.; YOUSSEF, D. T. A.; SCHMIDT, E. W. Structure of trichamide, a cyclic peptide from the bloom-forming cyanobacterium *Trichodesmium erythraeum*, predicted from the genome sequence. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 6, p. 4382–4387, 2006.

TAN, L. T.; SITACHITTA, N.; GERWICK, W. H. The guineamides, novel cyclic depsipeptides from a Papua New Guinea collection of the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 6, p. 764–771, 2003.

TAN, L. T.; WILLIAMSON, R. T.; GERWICK, W. H.; WATTS, K. S.; MCGOUGH, K.; JACOBS, R. cis,cis- and trans,trans-Ceratospongamide, new bioactive cyclic heptapeptides from the Indonesian red alga *Ceratodictyon spongiosum* and symbiotic sponge *Sigmadocia symbiotica*. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 65, n. 2, p. 419–425, 2000.

TAUTZ, T.; HOFFMANN, J.; HOFFMANN, T.; STEINMETZ, H.; WASHAUSEN, P.; KUNZE, B.; HUCH, V.; KITSCHKE, A.; REICHENBACH, H.; HÖFLE, G.; MÜLLER, T.; KALESSE, M. Isolation, structure elucidation, biosynthesis, and synthesis of antalid, a secondary metabolite from *Polyangium* species. **Organic Letters**, v. 18, n. 11, p. 2560–2563, 2016.

TILLET, D.; DITTMANN, E.; ERHARD, M.; DÖHREN, H. VON; BÖRNER, T.; NEILAN, B. A. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: An integrated peptide-polyketide synthetase system. **Chemistry and Biology**, v. 7, n. 10, p. 753–764, 2000.

TRAVIN, D. Y.; METELEV, M.; SEREBRYAKOVA, M.; KOMAROVA, E. S.; OSTERMAN, I. A.; GHILAROV, D.; SEVERINOV, K. Biosynthesis of translation inhibitor klebsazolicin proceeds through heterocyclization and N-Terminal amidine formation catalyzed by a single YcaO enzyme. **Journal of the American Chemical Society**, v. 140, n. 16, p. 5625–5633, 2018.

VESTOLA, J.; SHISHIDO, T. K.; JOKELA, J.; FEWER, D. P.; AITIO, O.; PERMI, P.;

WAHLSTEN, M.; WANG, H.; ROUHIAINEN, L.; SIVONEN, K. Hassallidins, antifungal glycolipopeptides, are widespread among cyanobacteria and are the end-product of a nonribosomal pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 18, p. 1909–1917, 2014.

VILLADSEN, N. L.; HANSEN, B. K.; SVENNINGSSEN, E. B.; JØRGENSEN, K. H.; TØRRING, T.; POULSEN, T. B. Stendomycin and pantomycin are identical natural products: preparation of a functionalized bioactive analogue. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 83, n. 13, p. 7303–7308, 2018.

WÄSPI, U.; BLANC, D.; WINKLER, T.; RÜEDI, P.; DUDLER, R. Syringolin, a novel peptide elicitor from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* that induces resistance to *Pyricularia oryzae* in rice. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 11, n. 8, p. 727–733, 1998.

WATANABE, T.; FUKUHARA, K.; MURAO, S. Structural elucidation of alpha-MAPI, a novel microbial alkaline proteinase inhibitor, produced by *Streptomyces nigrescens* WT-27. **Tetrahedron Letters**, v. 20, n. 7, p. 625–628, 1979.

WEI, M.; DENG, J.; WANG, S.; LIU, N.; CHEN, Y. A simple reverse genetics approach to elucidating the biosynthetic pathway of nocathiacin. **Biotechnology Letters**, v. 33, n. 3, p. 585–591, 2011.

WILLIAMS, D. E.; CRAIG, M.; HOLMES, C. F. B.; ANDERSEN, R. J. Ferintoic acids A and B, new cyclic hexapeptides from the freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 6, p. 570–575, 1996.

WILLIAMS, P. G.; YOSHIDA, W. Y.; MOORE, R. E.; PAUL, V. J. Isolation and structure determination of obyanamide, a novel cytotoxic cyclic depsipeptide from the marine cyanobacterium *Lyngbya confervoides*. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 1, p. 29–31, 2002.

WILLIAMS, P. G.; YOSHIDA, W. Y.; MOORE, R. E.; PAUL, V. J. Micromide and guamamide: cytotoxic alkaloids from a species of the marine cyanobacterium *Symploca*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 1, p. 49–53, 2004.

XIE, Y.; CHEN, R.; SI, S.; SUN, C.; XU, H. A New nucleosidyl-peptide antibiotic, sansanmycin. **The Journal of Antibiotics**, v. 60, n. 2, p. 158–161, 2007.

XIE, Y.; XU, H.; SI, S.; SUN, C.; CHEN, R. Sansanmycins B and C, new components of sansanmycins. **The Journal of Antibiotics**, v. 61, n. 4, p. 237–240, 2008.

XUE, M.; KIM, C. S.; HEALY, A. R.; WERNKE, K. M.; WANG, Z.; FRISCHLING, M. C.; SHINE, E. E.; WANG, W.; HERZON, S. B.; CRAWFORD, J. M. Structure elucidation of colibactin and its DNA cross-links. **Science**, v. 365, n. 6457, p. eaax2685, 2019.

YU, Y.; DUAN, L.; ZHANG, Q.; LIAO, R.; DING, Y.; PAN, H.; WENDT-PIENKOWSKI, E.; TANG, G.; SHEN, B.; LIU, W. Nosiheptide biosynthesis featuring a unique indole side ring formation on the characteristic thiopeptide framework. **ACS chemical biology**, v. 4, n. 10, p. 855–864, 2009.

ZAFRIR-ILAN, E.; CARMELI, S. Eight novel serine proteases inhibitors from a water bloom of the cyanobacterium *Microcystis* sp. **Tetrahedron**, v. 66, n. 47, p. 9194–9202, 2010.

ZHANG, N.; LIU, L.; SHAN, G.; CAI, Q.; LEI, X.; HONG, B.; WU, L.; XIE, Y.; CHEN, R.

Precursor-directed biosynthesis of new sansanmycin analogs bearing para-substituted-phenylalanines with high yields. **Journal of Antibiotics**, v. 69, n. 10, p. 765–768, 2016.

ZHANG, W.; NTAI, I.; BOLLA, M. L.; MALCOLMSON, S. J.; KAHNE, D.; KELLEHER, N. L.; WALSH, C. T. Nine enzymes are required for assembly of the pacidamycin group of peptidyl nucleoside antibiotics. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 14, p. 5240–5243, 2011.

ZHANG, W.; OSTASH, B.; WALSH, C. T. Identification of the biosynthetic gene cluster for the pacidamycin group of peptidyl nucleoside antibiotics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 39, p. 16828–16833, 2010.

ZI, J.; LANTVIT, D. D.; SWANSON, S. M.; ORJALA, J. Lyngbyaureidamides A and B, two anabaenopeptins from the cultured freshwater cyanobacterium *Lyngbya* sp. (SAG 36.91). **Phytochemistry**, v. 74, p. 173–177, 2012.

ZIEMERT, N.; ISHIDA, K.; QUILLARDET, P.; BOUCHIER, C.; HERTWECK, C.; MARSAC, N. T. DE; DITTMANN, E. Microcyclamide biosynthesis in two strains of *Microcystis aeruginosa*: from structure to genes and vice versa. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 6, p. 1791–1797, 2008.