# **UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

JAIRO IVÁN QUINTANA BULLA

Estudo microbiológico e químico de bactérias cultiváveis associadas à esponja marinha *Tedania brasiliensis*.

São Carlos

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Assinatura: Data:

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Bulla, Jairo Iván Quintana

Estudo microbiológico e químico de bactérias cultiváveis associadas à esponja marinha Tedania brasiliensis. / Jairo Iván Quintana Bulla. — São Carlos, 2022.

192 f.

Tese (Doutorado em Química Orgânica e Biológica) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2022.

Edição revisada

Orientador: Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck

1. Produtos naturais. 2. Bactéria marinha. 3. Metabolômica. 4. Features. 5. Glicoglicerolipídeos. . I. Título.



### Jairo Iván Quintana Bulla

### **Exemplar Revisado**

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

Estudo microbiológico e químico de bactérias cultiváveis associadas à esponja marinha *Tedania brasiliensis*.

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

2022

#### **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao Professor Dr. Roberto G. S. Berlinck pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa. Pela orientação que contribuiu significativamente no meu crescimento profissional.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela Bolsa de Doutorado no País (Processo FAPESP Nº 2016/16033-3), e por todo o apoio financeiro para o desenvolvimento deste projeto.

Ao Professor Dr. Eduardo Hajdu do Museu Nacional da Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ pela coleta da esponja marinha *Tedania brasiliensis*.

Ao Professor Dr. Antônio G. Ferreira da Universidade Federal de São Carlos-UFSCar pelo apoio técnico na aquisição das análises de RMN.

Á Dra. Luciane A. Chimetto Tonon pela colaboração e ensino no isolamento das bactérias da esponja *T. Brasiliensis*.

À seção de Pós-Graduação do Instituto de Química de São Carlos-IQSC pela ajuda e colaboração durante esses anos.

Agradeço à Dra. Fabiana T. R. Martinelli e à Dra. Karin F. B. Camargo pelo inestimável e permanente apoio técnico no Grupo de Química Orgânica de Sistema Biológico.

A todos os colegas atuais e ex-integrates do grupo por todo o auxílio, sugestões, dicas e companhia durante as longas jornadas de trabalho.

Aos amigos por toda a ajuda, amizade e apoio ao longo de todo esse doutorado, que fizeram essa viagem mais aconchegante e suportável Vítor Freire, Mirelle Takaki, Leandro Oliveira, Marcelo Amorim, Fabiana Rodrigues, Juliano Slivinski. Sem dúvida amigos que vou conservar para sempre.

Menção separada e especial para Laura loca, porque você foi sempre muito especial comigo. Teu apoio e amizade incondicionais foram vitais nessa caminhada que por momentos se complicava bastante. Brigado mesmo!

Aos meus amigos da graduação Milton Sanabria, Leonardo Jiménez, Diego Quiroga, Jair Manrique, Alejandro Lara e Javier Patarroyo, pelas risadas e momentos de distração na distância, que ajudaram a aliviar a carga.

Ao maravilhoso e lindo povo Brasileiro por me acolher com carinho durante esses cinco anos. Muito obrigado por me fazer sentir em casa em cada lugar que eu fui. Minha eterna gratidão com vocês.

Quero agradecer muito especialmente à Karen Mejía, porque juntos empreendemos esse caminho de deixar o nosso país e as nossas famílias, por trás de um objetivo. Teu constante apoio e amor foram fundamentais durante esse longo e difícil caminho. Vai dar tudo certo boneca!

Quiero agradecer a mis padres Jairo Quintana e Isabel Bulla. Su apoyo, paciencia y amor incondicionales me han traído hasta acá. Han sido mi motor durante toda la vida y mi mayor admiración. Los amo viejos!

Finalmente, quero agradecer à vida, às circunstância vividas ao longo destes cinco anos. Aos bons, maus e péssimos momentos vividos porque me forjaram na solidão o que sou hoje.

#### **RESUMO**

QUINTANA-BULLA, J. I. Estudo microbiológico e químico de bactérias cultiváveis associadas à esponja marinha *Tedania brasiliensis*. 2022, Tese (Doutorado) — Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022.

As esponjas marinhas são reconhecidas como uma importante fonte de compostos biologicamente ativos. Evidências acumuladas ao longo das últimas décadas têm comprovado que os verdadeiros produtores dos compostos isolados de esponjas são micro-organismos, principalmente bactérias e cianobactérias, simbiontes ou associadas a estes animais. Levando-se em conta que alcalóides bromopirrólicos derivados da pseudoceratidina previamente isolados da esponja marinha Tedania brasiliensis são estruturalmente relacionados a outros alcaloides pirrólicos previamente isolados de bactérias marinhas, neste trabalho foram investigadas 87 linhagens de bactérias isoladas da esponja T. brasiliensis para inicialmente se determinar se estas linhagens eram produtoras da pseudoceratidina e/ou derivados. Os resultados de análises de desreplicação obtidos para diferentes condições de crescimento empregadas para as bactérias isoladas de T. brasiliensis não indicaram a produção destes compostos por nenhuma das linhagens. Assim, realizou-se estudo de metabolômica e desreplicação dos extratos de meios de cultura produzidos pelas mesmas bacterias. O emprego da abordagem de metabolômica não-direcionada utilizando-se ferramentas computacionais XCMS Online e GNPS sob diferentes condições de cultivo, em conjunto com dados de atividades biológica, levou ao isolamento e a elucidação estrutural completa de quatro novos glicoglicerolipídeos (J55\_C8 a J55\_C11) a partir do meio de cultivo da linhagem bacteriana Microbacterium testaceum J55 no meio YEME. A estratégia utilizada e os resultados obtidos demostraram a utilidade do emprego de ferramentas de metabolômica nas etapas iniciais da triagem química e biológica para a priorização de linhagens bacterianas para o seu estudo químico, bem como para direcionar o processo de isolamento e purificação de metabólitos secundários, incrementando a eficiência na descoberta de moléculas inéditas e potencialmente bioativas.

Palavras chave: bactéria marinha, produtos naturais, metabolômica, *features*, glicoglicerolipídeos.

### **ABSTRACT**

QUINTANA-BULLA, J. I. Microbiological and chemical study of cultivable associated bacteria of the marine sponge *Tedania brasiliensis*. 2022, Thesis (PhD) — Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022.

Marine sponges are recognized as an important source of biologically active compounds. Evidences accumulated over the last decades have proven that bacteria are the true producers of several sponge secondary metabolites, either symbionts or associated to these animals. Considering that bromopyrrole alkaloids related to pseudoceratidine previously isolated from the marine sponge *Tedania brasiliensis* are structurally closely related to brominated pyrroles isolated from marine bacteria, in this work, 87 cultivable bacterial strains isolated from *T. brasiliensis* were investigated to establish whether these strains were or not producers of pseudoceratidine derivatives. Results of dereplication analyses obtained for extracts of growth media of these bacteria in different growing conditions did not show the production of these compounds. Therefore, metabolomics and dereplication investigations were performed with the extracts of growth media produced by these bacteria. Use of an untargeted metabolomics approach employing modern computational tools like XCMS Online and GNPS under different culture conditions, combined with biological activity results, lead to the isolation and complete structural elucidation of four new glycoglycerolipids (J55\_C8 to J55\_C11) from the bacterial strain Microbacterium testaceum J55 grown in YEME medium. The approach employed and the results obtained demonstrated the utility of metabolomics tools at the early stages of the chemical and biological screening process, aiming to prioritize the selection of bacterial strains, as well as to direct the isolation and purification of secondary metabolites, therefore improving the efficiency of the discovery of potentially new bioactive metabolites.

Key words: marine bacteria, natural products, metabolomics, features, glycoclycerolipids.

# **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1.1 — Origem das pequenas moléculas aprovadas como medicamentos entre 1981-2019, n = 1394.	18
Figura 1.2 — Exemplos de PNMs aprovados como medicamentos e candidatos em testes de fases clínicas avançadas.	19
Figura 1.3 — Diversidade das comunidades microbianas bacterianas associadas às esponjas marinhas ao nível de Filo.	21
Figura 1.4 — Produtos naturais isolados de esponjas marinhas e posteriormente identificados de origem bacteriano por técnicas independentes de cultivo.	23
Figura 1.5 — Produtos naturais marinhos de origem microbiana identificados no metagenoma das esponjas produtoras ou de bactérias cultiváveis isoladas das esponjas.	24
Figura 1.6 — Alcalóides bromopirrólicos isolados de esponjas marinhas.	26
Figura 1.7 — Alcalóides bromopirrólicos com atividade dissuasiva da predação por peixes.	27
Figura 1.8 — Precursores biogenéticos da stevensina (26).	30
Figura 1.9 — Origem biossintética da oroidina (22), a himenidina (23) e a clathrodina (39), como os precursores de alcalóides pirról-imidazólicos mais complexos.	30
Figura 1.10 — Alcalóides bromopirrólicos produzidos por bactérias marinhas.	32
Figura 1.11 — Compostos isolados a partir de esponjas do gênero <i>Tedania</i> .	33
Figura 1.12 — Derivados da pseudoceratidina isolados da esponja marinha <i>Tedania brasiliensis</i> .	35
Figura 1.13 — Fluxograma de trabalho na plataforma XCMS Online para a análise de dados de metabolômica não direcionada por LC-HRMS.	39
Figura 1.14 — Representação esquemática da criação de redes moleculares na plataforma GNPS.	40
Figura 4.1 — Fluxograma de extração e fracionamento dos extratos das bactérias isoladas da esponja marinha <i>T. brasiliensis</i> .	50
Figura 4.2— Procedimentos de crescimento e extração das linhagens de bacterias isoladas de <i>T. brasiliensis</i> selecionadas para o estudo metabolômico. a) crescimento com a mistura das resinas XAD. b) crescimento com fragmentos de algodão.	56
Figura 4.3 — Procedimento de extração do cultivo em maior escala da linhagem bacteriana J55, isolada da esponja marinha <i>T. brasiliensis</i> .	60

Figura 4.4 — Fluxograma do fracionamento do extrato J55_X.	61
Figura 4.5— Cromatograma da separação por HPLC em fase reversa da fração J55_X5C.	62
Figura 4.6 — Cromatograma da separação por HPLC em fase reversa da fração J55_A4D.	62
Figura 5.1 — Cromatogramas de massas de alta resolução dos extratos do meio de cultivo da bactéria J16 obtidos pelas duas metodologias: a) perfil cromatográfico do extrato obtido com a adição da mistura das resinas XAD ao meio de cultivo no começo do crescimento; b) perfil cromatográfico do extrato obtido com a adição da mistura das resinas XAD ao meio de cultivo depois de 7 dias de crescimento; c) controle negativo do meio de cultivo com a adição da mistura das resinas XAD no início do crescimento.	66
Figura 5.2 — Abundância dos phyla/classe de bactérias presentes no metagenoma da esponja <i>Tedania brasiliensis</i> , esponjas produtoras de alcalóides bromopirrólicos ( <i>Agelas</i> spp.) e esponjas não produtoras de bromopirróis ( <i>Tedania</i> spp.).	68
Figura 5.3 — Cromatogramas de massas de alta resolução das frações metanólicas dos extratos das linhagens J15, J17 e J49. Os picos de interesse estão indicados com flechas e as respectivas massas exatas (em $m/z$ ) dos espectros de massas de cada um dos sinais cromatográficos. As condições de análise foram as descritas na seção 4.2.5.	70
Figura 5.4 — Árvore filogenética de junção de vizinhos das espécies de <i>Ruegeria</i> baseada no sequenciamento parcial do gene 16S rRNA.	73
Figura 5.5 — Árvore filogenética de junção de vizinhos das espécies de <i>Vibrio</i> baseada no sequenciamento do gene 16S rRNA.	74
Figura 5.6 — Fotografias das linhagens de bacterias isoladas a partir da esponja <i>T. brasiliensis</i> selecionadas para realização de estudo metabolômico.	80
Figura 5.7 — Estruturas dos compostos identificados de bactérias isoladas de esponjas marinhas crescidas com adição de fragmentos de algodão no meio de cultivo.	81
Figura 5.8— Fotografias do crescimento da linhagem J55 em placas dos meios sólidos a) MA, b) A1, c) AM3, d) ASW-A e e) YEME. Observa-se a clara mudança no tamanho e cor das colônias nos diferentes meios.	83
Figura 5.9— a) Partição com acetato de etila dos extratos dos meios de cultivo da bactéria J55 crescidos na presença da mistura das resinas XAD nos meios utilizados. b) Cromatogramas de íons totais (TICs) obtidos das frações de acetato de etila dos extratos XAD da bactéria J55. c) Ampliação na qual pode se-observar algumas das diferenças obtidas nos perfis químicos.	83

Figura 5.10 — <i>Cloud plots</i> que comparam os perfis metabolômicos da linhagem <i>Microbacterium testaceum</i> J55 com os brancos dos meios de cultivo: a) MB, b) A1-modificado, c) YEME, d) AM3, e e) ASW-A. Os resultados foram filtrados para <i>features</i> com um incremento ( <i>fold change</i> ) maior a 100.	86
Figura 5.11 — Espectros de massas dos íons a) $m/z$ 716,18 em 6,05 min, b) $m/z$ 716,18 em 6,23 min e c) $m/z$ 730,19 em 6,98 min. Pode-se observar claramente nas ampliações dos espectros, o padrão de distribuição isotópica característico para 3 átomos de cloro. d) cromatogramas de íon extraído (XIC) das $m/z$ 716,18 e 730,19 tanto no extrato quanto no controle negativo, que mostra que estes picos estão presentes somente no extrato da bactéria.	89
Figura 5.12 — Gráfico de nuvens das análises pareadas dos perfis metabólicos da bactéria <i>M. testaceum</i> J55 nos meios a) ASW-A ( <i>up</i> ) vs YEME ( <i>down</i> ), b) AM3 ( <i>up</i> ) vs YEME ( <i>down</i> ) e c) AM3 ( <i>up</i> ) vs ASW-A ( <i>down</i> ).	91
Figura 5.13 — Gráficos de <i>box-and-whisker</i> gerados pelo XCMS Online da análise multigrupo que mostram a abundância relativa das <i>features</i> mais destacadas nos 5 meios de crescimento testados para a bacteria <i>M. testaceum</i> J55.	93
Figura 5.14 — Análises UPLC-HRMS dos extratos da bactéria J55. a) Extrato da resina HP-20. b) Extrato da mistura das resinas XAD-2, -4 e -7. c) Extrato de AcOEt do meio de cultivo.	94
Figura 5.15 — Análises de redes moleculares clássicas para frações obtidas do meio de crescimento da linhagem <i>M. testaceum</i> J55. a) Rede molecular com os nodos presentes somente no extrato bruto e as frações. Os gráficos de pizza representam a distribuição dos compostos nas frações. b) <i>Cluster</i> de massas detectados na fração bioativa J55_X5.	97
Figura 5.16 — Espectro de massas alta resolução do composto J55_C8 por ionização por <i>electrospray</i> em modo positivo (HRMS-ESI <sup>+</sup> ).	98
Figura 5.17 — Estrutura plana do composto J55_C8. Principais correlações de HMBC e COSY para J55_C8.	101
Figura 5.18 — Estrutura do composto J55_C8 (R = H) e o derivado peracetilado J55_C8PA (R = Ac).	104
Figura 5.19 — Espectro de massas de fragmentação do composto J55_C8.	105
Figura 5.20 — Espectros de massas de alta de alta resolução (a) e de fragmentação (b) dos compostos J55_C9 e J55_C10.	106
Figura 5.21 — Espectros de massas de alta resolução (a) e de fragmentação (b) do composto J55_C11.	110

açúcares com o cloridrato do éster metílico da L-cisteína.	111
Figura 5.23 — Ampliação dos espectros de $^1$ H-RMN (600 MHz, Piridina $d_5$ ) na região dos sinais H-2 dos derivados tiazolidina realizados para: a) a D-glicose, b) a D-manose, e c) a mistura de D-glicose e D-manose.	112
Figura 5.24 — Comparação dos sinais H-2 dos derivados de tiazolidina dos açúcares dos compostos J55_C9 e J55_C11 com os dos padrões de D-glicose e D-manose.	114
Figura 5.25 — Estruturas completas dos glicoglicerolipídeos inéditos isolados a partir do meio de cultivo da linhagem de bactéria <i>Microbacterium testaceum</i> J55, isolada da esponja <i>T. brasiliensis</i> .	114
Figura 5.26 — Metabólitos secundários isolados do meio de cultivo de bactérias do gênero <i>Microbacterium</i> sp.	117

# **LISTA DE TABELAS**

Tabela 5.1 — Resultados da busca na base de dados DNP das três linhagens selecionadas com perfis químicos de destaque.	70
Tabela 5.2 — <i>Gene clusters</i> identificados no genoma da bactéria J17 <i>Vibrio</i> sp. pelo software online antiSMASH 4.0.	77
Tabela 5.3 — <i>Gene clusters</i> identificados no genoma da bactéria J49 <i>Ruegeria</i> sp. pelo software online antiSMASH 4.0.	78
Tabela 5.4 — Atividade biológica dos extratos e as frações obtidos a partir do meio de crescimento da linhagem <i>M. testaceum</i> J55 nos bioensaios de ação anti-plasmodial, antileishmania e de citotoxicidade contra célula de câncer de mama (MCF-7).	96
Tabela 5.5 — Dados de RMN do composto J55_C8 (MeOH- $d_4$ ; <sup>1</sup> H em 600 MHz, <sup>13</sup> C em 150 MHz).	100
Tabela 5.6 — Dados espectroscópicos de RMN do derivado peracetilado J55_C8PA (CDCl <sub>3</sub> ; ¹H em 600 MHz, ¹³C em 150 MHz).	102
Tabela 5.7— Dados espectroscópicos de RMN do composto J55_C11 (MeOH $d_4$ ; <sup>1</sup> H em 600 MHz, <sup>13</sup> C em 150 MHz).	107
Tabela 5.8 — Dados espectroscópicos de RMN do composto J55_C11 peracetilado (CDCl <sub>3</sub> ; <sup>1</sup> H em 600 MHz, <sup>13</sup> C em 150 MHz).	109

# LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

δ Deslocamento químico

BGC Biosynthetic Gene Cluster (Agrupamento Gênico de Biossíntese)

COSY Homonuclear Correlation Spectroscopy

DAD Diode Array Detector (Detector de Arranjo de Diodos)

DDA Data Dependent Acquisition (Aquisição Dependente de Dados)

DNP Dictionary of Natural Products (Dicionário de Produtos Naturais)

ELSD Evaporative Light Scattering Detector (Detector de Espalhamento

de Luz Evaporativo)

ESI Electrospray Ionization (Ionização por Eletrospray)

GNPS Global Natural Products Social Molecular Networking

HMBC Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HPLC High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida

de Alta Eficiência)

HSQC Heteronuclear Single Quantum Coherence

J Constante de acoplamento

LC-HRMS Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry

(Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massas de Alta

Resolução)

*m/z* Razão massa/carga

MA *Marine Agar* (Ágar Marinho)

MB Marine Broth (Caldo Marinho)

MeCN Acetonitrila

MS Mass Spectrometry (Espectrometria de Massas)

PNs Produtos Naturais

PNMs Produtos Naturais Marinhos

QToF Quadrupole-Time of Flight Detector (Detector de Quadropolo-

Tempo de Voo)

RMN Ressonância Magnética Nuclear

SPE Solid Phase Extraction (Extração em Fase Sólida)

TFA Ácido Trifluoroacético

TIC Total Ion Chromatogram (Cromatograma de Íons Totais)

t<sub>R</sub> Tempo de Retenção

UPLC-HRMS Ultra High Performance Liquid Chromatography-High Resolution

Mass Spectrometry (Cromatografia Líquida de Ultra Alta

Eficiência-Espectrometria de Massas de Alta Resolução)

UPLC-MS/ Ultra High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass

MS Spectrometry (Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência-

Espectrometria de Massas en Tandem)

XIC Extracted Ion Chromatogram (Cromatograma de Íon Extraído)

YEME Yeast Extract Malt Extract Medium (Meio de Extrato de Levedura

Extrato de Malte)

# SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Importância dos produtos naturais	18
1.2 Produtos naturais marinhos	19
1.3 As esponjas marinhas e seu microbioma associado	20
1.4 Produtos naturais de micro-organismos associados às esponjas marinhas	22
1.5. Alcalóides bromopirrólicos de organismos marinhos	25
1.6 O gênero <i>Tedania</i>	32
1.6.1 A esponja <i>Tedania brasiliensis</i>	34
1.7 Problemas e alternativas para a produção de metabólitos secundários	35
1.8 Metabolômica no estudo da química dos produtos naturais	36
2 JUSTIFICATIVA	42
3. OBJETIVOS	44
4. MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1 Procedimentos experimentais gerais	45
4.1.1 Análises por HPLC-DAD-ELSD-MS	45
4.1.2 Condições gerais de análise por UPLC-HRMS	45
4.1.3 Cromatografía líquida de alta eficiência	46
4.1.4 Ressonância magnética nuclear	46
4.1.5 Solventes, reagentes e meios de cultivo	46
4.1.6 Condicionamento e limpeza das resinas de extração	47
4.2 Coleta da esponja marinha <i>Tedania brasiliensis</i>	47
4.3 Isolamento, cultivo e preservação das bactérias associadas à esponja marinha <i>T. brasiliensis</i>	48
4.4 Crescimento em escala analítica e extração do meio de cultivo	48
4.5 Fracionamento dos extratos	49
4.6 Análises das frações dos extratos por UPLC-MS/MS	50
4.7 Crescimento em maior escala das linhagens selecionadas	51
4.7.1 Estudo químico da linhagem Vibrio sp. J17	52

4.7.2 Estudo químico da linhagem <i>Ruegeria</i> sp. J49	52
4.8 Classificação taxonômica das linhagens J15, J17 e J49 selecionadas para estudo químico	53
4.9 Sequenciamento e análise dos genomas das bactérias <i>Vibrio</i> sp. J17 e <i>Ruegeria</i> sp. J49	53
4.9.1 Isolamento do DNA	53
4.9.2 Sequenciamento e análise dos genomas	54
4.10 Abordagem metabolômica na investigação do metabolismo secundário de bactérias cultiváveis associadas à esponja marinha <i>Tedania brasiliensis</i>	54
4.10.1 Seleção das linhagens	54
4.10.2 Crescimento e extração em pequena escala das linhagens selecionadas	55
4.10.3 Análises por UPLC-HRMS	56
4.10.4 Análises de metabolômica na plataforma XCMS Online	57
4.10.5 Análises de redes moleculares	58
4.10.6 Classificação taxonômica da linhagem J55	58
4.10.7 Estudo químico da linhagem <i>Microbacterium testaceum</i> J55	59
4.10.7.1 Crescimento e extração	59
4.10.7.2 Fracionamento e purificação	60
4.10.7.3 Determinação da configuração absoluta de resíduos de açúcares	63
4.10.7.3.1 Preparo dos derivados tiazolidina dos padrões de D-glicose e D-manose com cloridrato do éster metílico da L-cisteína	63
4.10.7.3.2 Preparo dos derivados de tiazolidina dos açúcares dos compostos isolados da linhagem J55	63
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
5.1 Isolamento, crescimento e preservação das bactérias associadas à esponja <i>T. brasiliensis</i>	65
5.2 Crescimento em escala analítica e extração do meio de cultivo	65
5.3 Análises por UPLC-MS/MS das frações dos extratos produzidos por bactérias isoladas de <i>Tedania brasiliensis</i>	66
5.4 Classificação taxonômica das linhagens selecionadas	71
5.5 Estudo químico da linhagem <i>Vibrio</i> sp. J17	75

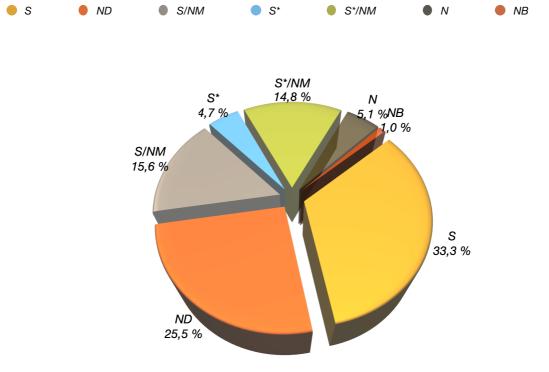
5.6 Estudo químico da linhagem <i>Ruegeria</i> sp. J49	76
5.7 Sequenciamento e análise dos genomas das bactérias <i>Vibrio</i> sp. J17 e <i>Ruegeria</i> sp. J49	77
5.7.1 Genoma da linhagem <i>Vibrio</i> sp. J17	77
5.7.2 Genoma de linhagem <i>Ruegeria</i> sp. J49	77
5.8 Estudo metabolômico de bactérias cultiváveis associadas à esponja marinha <i>T. brasiliensis</i>	79
5.8.1 Seleção das linhagens	79
5.8.2 Crescimento e extração em pequena escala das linhagens selecionadas	81
5.8.3 Estudo químico da linhagem J55	94
6. CONCLUSÕES	119
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	122
8 APÊNDICE	142

### 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Importância dos produtos naturais

Historicamente os produtos naturais (PNs) têm sido reconhecidos como uma fonte promissora e de inspiração de diversidade química com potencial terapêutico e econômico, como por exemplo na forma de medicamentos (HARVEY, EDRADA-EBEL e QUINN, 2015; ATANASOV et al., 2021) e agroquímicos (SPARKS e DUKE, 2021, CANTRELL, DAYAN e DUKE, 2012). De particular destaque têm sido a sua aplicação farmacológica como antibióticos, antitumorais, imunomoduladores, antivirais e antiparasitários, entre outros (BUTLER, ROBERTSON e COOPER, 2014). Na mais recente análise sobre os medicamentos de pequenas moléculas aprovados pela FDA desde 1981 até 2019, é evidente o grande impacto dos PNs no desenvolvimento de fármacos, uma vez que mais de duas terceiras partes do total são PNs ou derivados (NEWMAN e CRAGG, 2020) (Figura 1.1).

Figura 1.1 — Origem das pequenas moléculas aprovadas como medicamentos 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 com farmacóforo baseado em produtos naturais, /NM: compostos que mimetizam um produto natural.

#### 1.2 Produtos naturais marinhos

Devido à enorme biodiversidade presente nos oceanos e à sua pouca exploração, os organismos marinhos ganharam especial atenção como uma fonte de compostos bioativos com potencial farmacológico. Mais de 30.000 produtos naturais marinhos (PNMs) foram isolados ao longo das últimas décadas (CARROL et al. 2021). Os produtos naturais marinhos se diferenciam de metabólitos secundários oriundos de organismos terrestres, tanto por sua diversidade estrutural quanto pelos seus mecanismos de ação (LIANG, LUO e LUESCH, 2019). Este fato se reflete na maior porcentagem de sucesso na descoberta de novos modelos de fármacos para os PNMs (1 entre 2.550 compostos testados), em comparação com outras fontes de PNs (1 entre 5.000-10.000 compostos testados) (SIGWART et al. 2021). Até a presente data, 17 medicamentos de origem marinho foram clinicamente aprovados como tratamentos antivirais (1), anticâncer (2-3), analgésicos, entre outros. Adicionalmente, 29 PNMs estão em fases clínicas de teste I-III para aplicação terapêutica em ampla variedade de doenças (4-6) (https://www.marinepharmacology.org, consultado no dia 22-02-2022) (Figura 1.2).

Figura 1.2 — Exemplos de PNMs aprovados como medicamentos e candidatos em testes de fases clínicas avançadas.

Fonte: autoria própria.

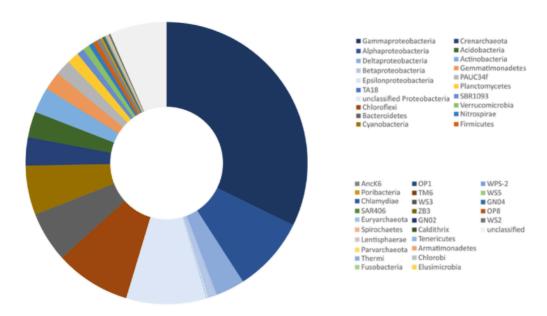
### 1.3 As esponjas marinhas e seu microbioma associado

As esponjas marinhas (phylum Porifera) destacam-se como uma das fontes mais prolíficas de metabólitos secundários. Mais de 5000 compostos foram isolados destes invertebrados marinhos, e apresentam grande diversidade de atividades biológicas como por exemplo: antitumoral, antiviral, antibiótica, anti-inflamatória, entre outras (BLUNT et al. 2017; MEHBUB et al. 2014). Esponjas marinhas são considerados os animais mais antigos da Terra, com registros que evidenciam sua presença há aproximadamente 635-660 milhões de anos (ZUMBERGE et al. 2018). Com cerca de 8.600 espécies formalmente descritas e uma estimativa de 15.000 espécies no total, estes animais são amplamente distribuídos ao redor do planeta principalmente, em mares tropicais, sub-tropicais e polares (WEBSTER e THOMAS, 2016; VAN SOEST et al. 2012).

Apesar de apresentarem uma enorme variedade de formas e tamanhos, a estrutura corporal das esponjas é muito simples. São organismos sésseis, filtradores sem órgãos diferenciados, nem sistema circulatório, digestivo ou de excreção, e com poucas células diferenciadas (BHUSHAN, PETERS e PIEL, 2017). Devido à falta de sistemas físicos de defesa (como espinhos, concha ou outros), as esponjas apresentam complexo e eficiente arsenal de defesas químicas contra predadores, patógenos microbianos e para competição territorial. Ao mesmo tempo, as esponjas marinhas formam associações simbióticas com densas comunidades microbianas que incluem bactérias, archaea e eucariotos unicelulares, as quais podem representar até 40% da biomassa das esponjas (WEBSTER e THOMAS, 2016; TAYLOR et al. 2007). Estas esponjas, chamadas de "alta abundância microbiana" HMA (high microbial abundance), possuem densidades microbianas de até 1010 bactérias por centímetro cúbico de esponja, excedendo a concentração de bactérias encontrada na água do mar de 2 a 4 ordens de magnitude. Esponjas de "baixa abundância microbiana" LMA (low microbial abundance) apresentam comunidades microbianas menos diversas, na ordem de 105-106 bactérias por grama de esponja (ABDELMOHSEN, BAYER e HENTSCHEL, 2014; HENTSCHEL, USHER e TAYLOR, 2012).

As comunidades microbianas associadas à esponjas apresentam uma notável diversidade filogenética de bactérias. No total 28 phyla bacterianos associados a esponjas foram identificados, dos quais 18 foram formalmente descritos e 10 candidatos, baseados tanto em métodos de cultivo quanto em estudos moleculares como o sequenciamento do gene 16S (HENTSCHEL et al. 2012). Entre os phyla mais destacados encontram-se Proteobacteria (Alpha-, Gamma- e Deltaproteobacteria), Cianobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Actinobacteria, Acidobacteria, Nitrospirae e o phylum candidato Poribacteria, exclusivo das esponjas (HENTSCHEL et al. 2012; PITA et al. 2018) (Figura 1.3). Estas complexas comunidades microbianas caracterizam-se por ser compostas tanto por bactérias generalistas presentes em várias espécies de esponjas de diversas regiões geográficas, bem como por bactérias altamente específicas presentes em espécies particulares de esponjas, mas não encontradas na água do mar, nos sedimentos ou em outros invertebrados marinhos (PITA et al. 2018). Embora o papel ecológico dessas associações bactérias-esponjas não esteja completamente esclarecido, supõe-se que os micro-organismos apresentam papel fundamental na nutrição, saúde e defesa das esponjas. Em troca, os micro-organismos recebem uma fonte estável e abundante de nutrientes como amônia, carboidratos e aminoácidos (ABDELMOHSEN, BAYER e HENTSCHEL, 2014).

Figura 1.3 — Diversidade das comunidades microbianas bacterianas associadas às esponjas marinhas ao nível de Filo.



Fonte: adaptado de PITA et al. 2018.

### 1.4 Produtos naturais de micro-organismos associados às esponjas marinhas

No centro destas relações simbióticas bactérias-esponjas encontram-se os PNs que, por um lado, apresentam papel fundamental na manutenção do equilíbrio ecológico destes complexos sistemas, e, por outro lado, dispõem de um grande potencial biotecnológico na forma de metabólitos secundários para o desenvolvimento de ingredientes ativos, sejam farmacológicos, cosméticos ou agrícolas. O fato de compostos isolados de esponjas muitas vezes apresentarem muita semelhança com compostos isolados de bactérias, ou com compostos isolados de espécies de distinta origem taxonômica, forneceram os primeiros indícios sobre a possibilidade destes compostos serem realmente produzidos por micro-organismos (KOBAYASHI e ISHIBASHI, 1993). Atualmente, vários estudos têm comprovado a origem microbiana de compostos inicialmente isolados de esponjas e outros invertebrados marinhos graças, entre outros, a modernos métodos de biologia molecular que permitem identificar o micro-organismo produtor sem a necessidade de isolá-lo (MCCAULEY et al. 2020).

A onnamida A (7) isolada inicialmente da esponja Theonella swinhoei e a psymberina (8) isolada das esponjas Psammocinia aff. bulbosa e Ircinia ramosa (SAKEMI et al. 1988; CICHEWICZ, VALERIOTE e CREWS, 2004; PETIT et al. 2004), foram dos primeiros compostos terem sua origem microbiana comprovada por métodos independentes de cultivo. A partir dos resultados de estudos da biossíntese da pederina (9), cuja produção havia sido estabelecida em uma bactéria do gênero Pseudomonas (PIEL, 2002; PIEL et al. 2004a), análises metagenômicas da esponja *T. swinhoei* permitiram identificar uma bactéria não cultivável, *Candidatus* Entotheonella factor, como a verdadeira produtora da onnamida A bem como da theopederina A (10) (PIEL et al, 2004b; WILSON et al. 2014). Da mesma forma, o agregado gênico de biossíntese (BGC, Biosynthetic Gene Cluster) da psymberina foi encontrado em uma bactéria não identificada no metagenoma da esponja P. aff. bulbosa (FISCH et al. 2009). Do metagenoma da esponja Mycale hentscheli foi identificado o BGC da mycalamida A (11), presente no genoma da bactéria não cultivável Candidatus Entomycale ignis, evidenciando que a produção microbiana de PNs estruturalmente similares pode ocorrer em táxons filogenéticos diversos (RUST et al. 2020; STOREY et al. 2020) (Figura 1.4).

Figura 1.4 — Produtos naturais isolados de esponjas marinhas e posteriormente identificados de origem bacteriano por técnicas independentes de cultivo.

Fonte: autoria própria.

O gênero *Candidatus* Entotheonella tem se mostrado como um prolífico produtor de produtos naturais com capacidades biossintéticas comparáveis com as das Actinobacterias. Pertencente ao phylum único Tectomicrobia, *C*. Entotheonella é considerado como o verdadeiro produtor da maioria dos PNs isolados de espécimes da esponja *T. swinhoei*, como a theopalauamida (12), o swinholido A (13), a ciclotheonamida A (14) e a keramamida B (15) (WILSON et al. 2014; BHUSHAN, PETERS e PIEL, 2017). A produção dos éteres difenílicos polibromados 16-17, comumente isolados a partir de espojas do gênero *Dysideidae*, foi confirmada em cianobactérias simbiontes da espécie *Hormoscilla spongeliae* por métodos independentes de cultivo (AGARWAL et al. 2017). Em outros casos, PNs previamente isolados de esponjas marinhas como a nazumamida A (18), a manzamina A (19), a bengamida E (20) e a microsclerodermina D (21), foram obtidos a partir de bactérias cultiváveis isoladas das esponjas marinhas ou de outras fontes microbianas, validando a hipótese da origem microbiana desses compostos (MCCAULEY et al. 2020) (Figura 1.5).

Um ponto crucial no desenvolvimento de medicamentos, é a disponibilidade em quantidades suficientes dos compostos de interesse sem prejudicar o ambiente natural no qual o(s) organismo(s) produtor(es) se encontra(m), ou comprometer a existência da(s) especie(s) biológica(s) produtora(s) do(s) metabólito(s) de interesse (MARRIS 2006). Um baixo rendimento no isolamento de compostos inviabiliza a obtenção das quantidades suficientes para a realização de testes clínicos e de produção em maior escala (NEWMAN 2016; GOMES et al. 2016). Garantir o suprimento necessário de potenciais agentes terapêuticos de maneira econômica e ecologicamente sustentável é um desafio que tem sido abordado através de várias estratégias biotecnológicas (aquacultura, maricultura, fermentação, engenheira genética, síntese enzimática) ou químicas (síntese total, semissíntese) (GOMES et al. 2016; LINDEQUIST, 2016; SHINDE, BANERJEE e MANDHARE, 2019). O fato de alguns PNMs, especialmente de esponjas, serem de origem microbiana, representa uma grande oportunidade de mitigar os problemas de suprimento de compostos bioativos de interesse biotecnológico, com a possibilidade de realizar o crescimento em meio de cultivo de micro-organismos associados às esponjas ou a expressão heteróloga da maquinaria biossintética em hospedeiros cultiváveis. Adicionalmente, o enorme potencial genético e de diversidade química torna possível o desenvolvimento de metodologias que permitam incrementar a produção de determinados compostos, bem como a diversificação dos metabólitos produzidos (RADJASA et al. 2011; LEAL et al.; 2014; BLOCKLEY et al. 2017; BRINKMANN, MARKER e KURTBÖKE, 2017).

Figura 1.5 — Produtos naturais marinhos de origem microbiana cujos BGCs têm sido identificados no metagenoma das esponjas produtoras ou em bactérias cultiváveis isoladas das esponjas.

Fonte: autoria própria.

### 1.5. Alcalóides bromopirrólicos de organismos marinhos

Alcalóides bromopirrólicos constituem uma classe característica de metabólitos secundários isolados de esponjas dos gêneros *Hymeniacidon* (Halichondriidae, Halichondrida), *Axinella* (Axinellidae, Halichondrida), *Axinyssa* (Halichondriidae, Halichondrida), *Callyspongia* (Callyspongiidae, Haplosclerida), *Eurypon* (Raspailiidae, Poecilosclerida), *Homaxinella* (Suberitidae, Hadromerida), *Stylissa* (Halichondriidae, Halichondrida) e principalmente *Agelas* (SILVA et al. 2011; INABA et al. 1998; SCALA et al. 2010; PARRA et al. 2018). Alcalóides bromopirrólicos tipicamente encontrados em esponjas marinhas incluem a oroidina (22) e análogos como a himenidina (23), as dispacamidas B e D (24, 25), a stevensina (26) e a spongiacidina B (27). Alguns destes derivados não apresentam o anel 2-aminoimidazol como a bromoaldisina (28) e a longamida B (29). Alcalóides

consideravelmente mais complexos incluem a sceptrina (30), a dibromopalau'amina (31), e a bromopirrolohomoarginina (32) (Figura 1.6).

Figura 1.6 — Alcalóides bromopirrólicos isolados de esponjas marinhas.

Fonte: autoria própria.

Apesar de serem rica fonte de proteínas em um ambiente caracterizado pela intensa atividade predatória, esponjas do Caribe apresentam um número muito limitado de predadores (RANDALL e HARTMAN, 1968), sugerindo que produzem compostos com função ecológica de proteção contra predação. Em testes de aquário, o extrato orgânico da esponja *Agelas clathrodes* apresentou atividade antipredatória para o peixe de recife *Thalassoma bifasciatum*, bem como contra vários peixes de recife em ensaios de campo. O fracionamento bioguiado do extrato identificou a oroidina (22) e o ácido 4,5-dibromopirrol-2-carboxílico (33) como os metabólitos responsáveis da inibição da predação (CHANAS et al. 1996). Em esponjas da familia Axinellidae, outros alcalóides bromopirrólicos foram identificados como defesas químicas. A stevensina (26) isolada da esponja *Axinella corrugata* também apresentou atividade anti-predatória para o peixe *T. bifasciatum* mediante

um fracionamento bioguiado da fração butanólica (WILSON et al. 1999). O mesmo efeito foi observado para a *N*-metildibromoisophakelina (**34**) isolada da esponja *Stylissa caribica* (ASSMANN, VAN SOEST e KÖCK, 2001) (Figura 1.7).

Figura 1.7 — Alcalóides bromopirrólicos com atividade dissuasiva da predação por peixes.

Fonte: autoria própria.

Estudos de relação estrutura atividade, realizados com alcalóides bromopirrólicos isolados de esponjas do gênero *Agelas*, determinaram que o anel pirrólico é necessário para a atividade inibitória a qual é dependente também do grau de bromação do anel. A adição de um grupo imidazol aumenta a atividade; no entanto, imidazois funcionalizados carentes do anel pirrólico não possuem atividade. Dos sete produtos naturais avaliados, a midcapamida (35) foi a mais ativa em ensaios em aquário contra *T. bifasciatum*. Porém, considerando-se a alta concentração da oroidina (22) e da dispacamida A (36) nos tecidos das esponjas, é muito provável que estes sejam os principais agentes responsáveis pera atividade anti-predatória da alimentação no ambiente natural (LINDEL et al. 2000).

Um dos possíveis mecanismos de ação da atividade anti-predatória destes alcalóides é pela interação com receptores celulares de cálcio, a qual pode ser via canais operados por voltagem ou pela via do canal de cálcio operado por armazenamento. A interação da bromoageliferina (37) e da dibromoageliferina (38) com ambas rotas de entrada de cálcio en linhas celulares de phaeocromocitoma PC12, mostrou a especificidade destes compostos pela inibição da via dos canais dependentes de voltagem (BICKMEYER, 2005).

Além de não sofrer predação, muitas esponjas mostram-se livres do recobrimento por organismos incrustantes, o que sugere que elas produzem e acumulam compostos para prevenir o fouling, ou seja, a colonização da sua superfície por parte de outros organismos. Investigações visando encontrar alternativas às baseadas em tintas com estanho, chumbo ou cobre, fazem uso justamente de PNMs com atividade anti-fouling (FUSETANI, 2004). A oroidina, a bromoageliferina e a mauritiamina, são exemplos de bromopirróis com atividade antifouling, especificamente como inibidores da formação de biofilmes bacterianos (TSUKAMOTO et al. 1996; YAMADA et al. 1997), os quais são determinantes nas primeiras etapas de fouling (FUSETANI, 2011), através de um mecanismo não biocida. Inspirados nessas estruturas, derivados semissintéticos da bromoageliferina e da oroidina foram preparados (RICHARDS et al. 2008), encontrando a dihidrooroidina como o composto mais promissor, o qual foi avaliado como aditivo antifouling em tintas para inibir a formação de biofilmes da bactéria Halomonas pacifica, envolvida no processo de micro-fouling marinho (MELANDER, et al.2009). Os resultados demonstraram a eficiência em ensaios em campo da dihidrooroidina para prevenir o fouling sem ser tóxica, ao não apresentar citotoxicidade, mostrando ser um candidato promissor para sua aplicação industrial devido à facilidade de obtenção por síntese química.

Desde o isolamento da dibromofakellina, em 1969 da esponja *Phakellia flabellata*, mais de 220 alcalóides pirrol-imidazólicos foram isolados. Além da sua utilidade como defesa química para o organismo produtor, a importância destes metabólitos está em seu potencial como agentes terapêuticos contra diversas doenças ao apresentarem uma ampla ampla variedade atividades biológicas como citotoxicidade, anti-inflamatória, antihistaminica, antimicrobiana, imunossupressora,

inseticida, entre outras (AL-MOURABIT, et al. 2011; SINGH e MAJIK, 2019; SEIPP, GESKE e OPATZ, 2021). A enorme diversidade estrutural desta classe de compostos têm motivado a pesquisa sobre a origem biossintética, a qual ainda não se esclareceu por completo. E por isso é tema de importantes investigações por elucidar os mecanismos moleculares através dos quais são gerados (AL-MOURABIT, et al. 2011; WANG et al. 2014; LINDEL, 2017; CHU et al. 2022).

Combinação de estudos sobre novos alcalóides pirrol-imidazolicos isolados com rotas de síntese "bioinspiradas", têm permitido formular hipóteses cada vez mais aceitas sobre a origem biossíntetica (AL-MOURABIT, et al. 2011). A oroidina (22), a himenidina (23) e a clathrodina (39) são considerados como os "blocos de construção primários" dos alcalóides pirról-imidazólicos mais complexos, os quais são formados através de reações de ciclização, oxidação, dimerização, e inclusive tetramerização (LINDEL, 2017). Considerando-se a presença dos núcleos pirrol e 2aminoimidazol nos intermediários 22, 23 e 39, postula-se uma origem biossintética comum a partir de aminoácidos proteinogênicos. Levando-se em conta considerações quimiotaxonômicas, as primeiras indagações sobre a biossíntese destes alcaloides propuseram a ornitina como precursor primário através de uma transformação do grupo α-amino em 2-aminoimidazolinona via um intermediário guanidínico, assim com da prolina (KITAGAWA et al. 1983; BRAEKMAN et al. 1992). O primeiro trabalho de biossíntese fazendo uso da incorporação de aminoácidos enriquecidos com <sup>14</sup>C em cultivos de células da esponja *Teichaxinella morchella*, sugeriu a prolina e a histidina como precursores da stevensina (26) via 3-amino-1-(2aminoimidazolil)-prop-1-eno (40) e o ácido 4,5-dibromopirrol-2-carboxílico (33) (Figura 1.8). (ANDRADE et al. 1999). Posteriormente, um estudo de incorporação de aminoácidos enriquecidos com <sup>14</sup>C na esponja *Axinella damicornis* empregando autoradiografia beta de imagem de alta resolução, confirmou a prolina como o precursor do núcleo pirrólico e demostrou que a lisina é o precursor do núcleo 2aminoimidazol e não a histidina (GENTA-JOUVE, et al. 2011). Essas descobertas foram recentemente corroboradas minerando-se o metabololoma de três esponjas produtoras de alcalóides pirrol-imidazólicos objetivando detectar intermediários biossintéticos. Os resultados mostraram que a homoarginina é um intermediário crucial que conecta a lisina na produção dos alcalóides, definindo assim as bases para a busca genômica em esponjas da rotas biogenéticas que elucidem definitivamente a maquinaria biossintética dos alcalóides pirról-imidazólicos (MOHANTY et al. 2020) (Figura 1.9).

Figura 1.8 — Precursores biogenéticos da stevensina (26).

Fonte:autoria própria.

Figura 1.9 — Origem biossintética da oroidina (22), a himenidina (23) e a clathrodina (39), como os precursores de alcalóides pirról-imidazólicos mais complexos.

$$R_2$$
 $R_2$ 
 $R_1$ 
 $R_2$ 
 $R_3$ 
 $R_4$ 
 $R_5$ 
 $R_4$ 
 $R_5$ 
 $R_5$ 
 $R_7$ 
 $R_7$ 

Oroidina (**22**)  $R_1 = R_2 = Br$ Himenidina (**23**)  $R_1 = Br$ ,  $R_2 = H$ Clathrodina (**39**)  $R_1 = R_2 = H$ 

Fonte: autoria própria.

Apesar de não existirem evidências experimentais que indiquem os mecanismos biossintéticos da utilização de intermediários simples, como a oroidina, na formação de alcalóides mais complexos, alguns resultados obtidos suportam essa hipótese. A partir de oroidina sintética marcada com <sup>15</sup>N foi obtida a benzosceptrina C (41) e a nagelamida H (42) utilizando-se preparações enzimáticas sem células das esponjas *Agelas sceptrum* e *Stylissa caribica* (WANG et al. 2010; STOUT et al. 2012a). Alcalóides pirrol-imidazólicos diméricos foram biossintetizados a partir de análogos clorados da oroidina por preparações enzimáticas da espoja *S. caribica*, implicando um mecanismo radical de transferência de elétron simples na formação da ligação C—C. Notavelmente, somente o extrato enzimático da esponja investigada foi capaz de levar a cabo a transformação dos análogos clorados, ja que nem outras esponjas nem outras enzimas que atuam mediante mecanismos radicalares funcionaram, o que indica a existência de uma maquinara biossintética específica (STOUT et al. 2012b).

Diferentes pirróis bromados já foram isolados de bactérias marinhas Gramnegativas. O primeiro destes compostos, a pentabromopseudilina (43), foi isolado do meio de cultura de uma bactéria marinha do gênero *Pseudoalteromonas*, e apresentou potente atividade antibiótica (BURKHOLDER, PFISTER e LEITZ, 1966; LOVELL, 1966). Outros derivados pirrólicos polibromados, o tetrabromopirrol (44) e o hexabromo-2-2'-bipirrol (45), também são produzidos por uma bactéria do gênero *Pseudoalteromonas* (ANDERSEN, WOLFE e FAULKNER, 1974; WRATTEN et al. 1977) (Figura 1.10).

Figura 1.10 — Alcalóides bromopirrólicos produzidos por bactérias marinhas.

Fonte: autoria própria.

### 1.6 O gênero Tedania

Com mais de 80 espécies formalmente descritas e aceitas (de VOOGD et al. 2022), o gênero *Tedania* tem sido pouco estudado desde o ponto de vista químico. As espécies desse gênero que foram estudadas são: *T. excavata, T. anhelans, T. digitata* e *T. ignis*. As espécies *T. ignis* e *T. anhelans* são conhecidas por causarem delicadas lesões na pele por contato provocando a sensação de queimadura, que em alguns casos pode gerar necrose dos tecidos afetados (ISBISTER e HOOPER, 2005).

Da esponja *T. excavata* foram isolados 13 esteróis contendo principalmente derivados  $\Delta^5$  com cadeias laterais saturadas e insaturadas (SELDES et al. 1988). O estudo químico do extrato metanólico da esponja *T. anhelans* forneceu a  $\beta$ -carbolina (46), os ácidos heteroaromáticos pirazol-3(5)-carboxílico (47) e 4-metilpirazol-3(5)-carboxílico (48), junto com as dicetopiperazinas Pro-Val, Pro-Leu, Pro-Phe e Pro-Tyr (PARAMESWARAN, NAIK e HEGDE, 1997). A 1-metilisoguanosina (49) foi isolada a

partir da esponja *T. digitata* e apresentou atividade antialérgica e anti-inflamatória (QUINN et al. 1980; COOK et al. 1980), bem como o caroteno tedanina (**50**) (OKUKADO, 1975) (Figura 1.11).

A esponja *T. ignis* foi a espécie de *Tedania* mais amplamente estudada, tendo sido isolada uma grande diversidade de compostos bioativos. O primeiro foi o macrolídeo citotóxico tedanolida (51), que apresentou ED<sub>50</sub> de  $2,5 \times 10^{-4}$  µg/mL em células de carcinoma humano de nasofaringe e de  $1,6 \times 10^{-5}$  µg/mL em células de leucemia linfocítica (SCHMITZ et al. 1984). De uma amostra desta esponja coletada nas Bahamas foram isolados os diarilheptanóis tedarenos A e B (52-53) como misturas em equilíbrio de atropoisômeros que se caracterizam por apresentarem quiralidade axial, central e planar, todas numa mesma estrutura (CONSTANTINO et al. 2012). Outro estudo reportou o isolamento do atisano- $3\beta$ ,16 $\alpha$ -diol (54) a partir de uma amostra coletada na Florida (SCHMITZ et al. 1983) (Figura 1.11).

Figura 1.11 — Compostos isolados a partir de esponjas do gênero *Tedania*.

Fonte: autoria própria.

### 1.6.1 A esponja Tedania brasiliensis

A esponja marinha *T. brasiliensis* é relativamente comum ao longo da faixa do litoral brasileiro compreendida entre os estados do Rio de Janeiro (Arraial do Cabo, Búzios) e Maranhão, e é encontrada a uma profundidade variável entre 3 m até 54 m. Caracteriza-se pela cor vermelha-rosa intensa, de consistência variável de macia a firme, bem como pela sua superfície que pode ser rugosa ou lisa, com a presença de pequena elevações vulcaniformes. À diferença de outras espécies do gênero, não se conhecem de casos de dermatite por contato com esta esponja. O extrato aquoso ou metanólico desta esponja apresentou atividade antimicrobiana contra *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilopsis*, *C. guiliermondii*, *Metschnikowia bicuspidata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaryomyces hansenii* e *Cryptococcus laurentii* (MOTHES, HAJDU e VAN SOEST, 2000).

A investigação do metabolismo secundário de *T. brasiliensis* foi realizada no laboratório do Professor Dr. Roberto Berlinck pela ex-aluna de doutorado Dra. Lizbeth Lorena L. Parra. Neste trabalho foram isolados uma série de derivados da pseudoceratidina (55-63) a partir do extrato metanólico da esponja, os quais apresentaram potente atividade anti-*Leishmania*, antimalárica e anti-*T. cruzi* (PARRA et al. 2018) (Figura 1.12). A partir desses resultados foram sintetizados 23 derivados com variações na cadeia poliamina e na porção aromática do esqueleto base, fornecendo os primeiros estudos de relação estrutura-atividade que estabeleceram as bases para o desenvolvimento de novas moléculas com atividade antiparasitária

contra amastigotas de *Leishmania* e contra *Plasmodium falciparum* (PARRA et al, 2018).

Figura 1.12 — Derivados da pseudoceratidina isolados da esponja marinha *Tedania brasiliensis*.

Fonte: autoria própria.

### 1.7 Problemas e alternativas para a produção de metabólitos secundários

O isolamento de compostos a partir de fontes naturais tem sido tradicionalmente direcionado pela atividade biológica, bem como por sua maior abundância. Tais abordagens frequentemente levam ao re-isolamento de compostos conhecidos, deixando de lado a investigação de compostos minoritários. Todavia, técnicas de sequenciamento genômico demostram que o potencial de microorganismos para produzir compostos é muito maior do que o as metodologias tradicionais de triagem indicam (MEDEMA e FISCHBACH, 2015), inclusive de organismos que se acreditavam bem estudados do ponto de vista químico (BENTLEY et al. 2002).

Um dos maiores desafios da pesquisa em produtos naturais é conseguir expressar por completo as capacidades biossintéticas dos micro-organismos em condições artificiais de crescimento no laboratório, que permitam a descoberta de

moléculas inéditas com potencial biotecnológico. Estima-se que apenas de 10 a 20% dos metabólitos expressos a partir dos genomas de micro-organismos são produzidos em condições de cultivo (WALSH e FISCHBACH, 2010). Nesse sentido, diversas e sofisticadas metodologias computacionais e moleculares têm sido desenvolvidas para identificar, expressar e manipular os agregados gênicos responsáveis pela biossíntese de metabólitos secundários, denominada abordagem orientada pela genômica (MEDEMA e FISCHBACH, 2015; RUTLEDGE e CHALLIS, 2015).

Por outro lado, metodologias que objetivam obter respostas metabólicas por meio de alterações químicas ou biológicas do meio de cultivo também são empregadas. Variáveis relacionadas ao crescimento microbiano em laboratório podem ser modificadas para favorecer a produção de metabólitos secundários, tais como: fontes de carbono e nitrogênio, pH, salinidade, temperatura, tempo de incubação ou aeração, entre outros. A modificação destes parâmetros facilmente acessíveis pode induzir a produção de um maior número de compostos ou melhores rendimentos por um mesmo micro-organismo. Essa metodologia chamada de OSMAC (*One Strain MAny Compounds*, uma linhagem - muitos compostos), tem sido empregada com sucesso em vários casos, podendo diversificar a produção de metabólitos secundários em diferentes micro-organismos (BODE et al. 2002; RATEB et al. 2011). A utilização de matrizes sólidas que simulam o ambiente natural do qual linhagens foram isoladas também é uma estratégia bem-sucedida para aumentar a produção de metabólitos secundários (CONDREN et al. 2019; TIMMERMANS et al. 2019).

### 1.8 Metabolômica no estudo da química dos produtos naturais

Independentemente da abordagem empregada, são necessárias técnicas e ferramentas analíticas apropriadas para avaliar a resposta metabólica em diversas condições de cultivo. Componentes do meio de cultivo, produtos do metabolismo primário e secundário constituem misturas complexas com grande número de compostos químicos difíceis de serem analisadas por métodos tradicionais de isolamento e análise espectroscópica, ainda mais quando os compostos de interesse estão presentes em muito menor proporção. Além disso, diferentes

características físico-químicas próprias dos produtos naturais tornam seu isolamento uma tarefa complexa (BERLINCK et al. 2019).

Abordagens metabolômicas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (LC-HRMS) se tornaram alternativas poderosas para o estudo da diversidade química produzida por micro-organismos (FLOROS et al. 2016; COVINGTON, MCLEAN e BACHMANN, 2016). A metabolômica é definida como o estudo completo de moléculas pequenas, comumente conhecidas como metabólitos, de um determinado sistema biológico, e que fornece uma medida direta da produção e acúmulo de metabólitos pelo organismo ou sistema biológico de interesse (COVINGTON, MCLEAN e BACHMANN, 2016). A metabolômica oferece a possibilidade de investigar de maneira mais ampla o metabolismo de micro-organismos, em resposta a estímulos ou variações nas condições de crescimento, mediante a realização de análises qualitativas e quantitativas (KRUG e MÜLLER, 2014).

Os estudos de metabolômica podem se classificar em duas abordagens principais, metabolômica direcionada e metabolômica não-direcionada. A metabolômica direcionada é empregada para medir quali- e quantitativamente grupos ou classes definidos de metabólitos previamente definidos, com o intuito de responder a uma questão específica (PATTI, YANES e SIUZDAK, 2012). Na metabolômica direcionada tanto o preparo da amostra quanto a detecção dos metabólitos deve ser otimizada, diminuindo a predominância de compostos majoritários ou interferentes da matriz, permitindo análises mais limpas (ROBERTS et al. 2012). A metabolômica não-direcionada tem como objetivo a análise simultânea de todos os metabólitos presentes detectáveis em uma determinada amostra, incluindo compostos desconhecidos, fornecendo uma visão mais abrangente do metaboloma (PATTI, YANES e SIUZDAK, 2012). Análises de metabolômica não-direcionada representam um enorme desafio devido ao grande número de compostos a serem detectados e que apresentam características como massa molecular, solubilidade, polaridade e capacidade de ionização muito variadas. Soma-se a este conjunto de fatores a variação considerável de concentração de diferentes compostos das amostras a serem analisadas. Por tal motivo os resultados

obtidos dependem intrinsecamente de metodologias de extração, "clean-up" e análises selecionadas (YANES et al. 2011).

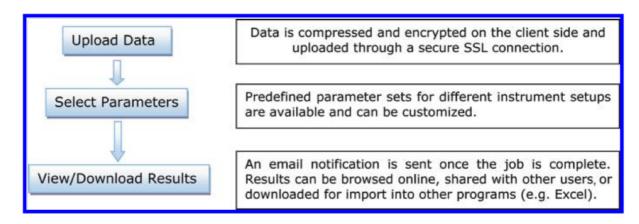
A aquisição, processamento, análise e interpretação dos dados obtidos a partir de análises metabolômicas constituem outra parte fundamental nos estudos de metabolômica, principalmente no que tem a ver com a anotação dos metabólitos detectados (BENIDDIR et al. 2021). A anotação de metabólitos em misturas complexas resulta de um conjunto de características (comumente designadas de *features*), como, por exemplo, íons com uma determinada razão massa-carga (*m/z*) e informação adicional descritiva como, por exemplo, tempo de retenção r<sub>t</sub> em análises cromatográficas entre outros (COVINGTON, MCLEAN e BACHMANN, 2016). Um grande desafio é o manejo do gigantesco volume de dados gerados nos experimentos de metabolômica não-direcionada, a qual é facilmente de milhares de *features* e, por isso, inviável de se realizar manualmente.

Importantes avanços foram realizados nos últimos anos com o desenvolvimento de diferentes ferramentas computacionais para o processamento e análise automática dos dados, que ajudam extrair, organizar e visualizar a informação ali contida (VAN DER HOOFT et al. 2020; BAUERMEISTER et al. 2022). A metodologia mais empregada em estudos de produtos naturais faz uso de análises de MS¹ para se analisar o metaboloma completo e priorizar linhagens a serem estudadas, bem como para encaminhar o isolamento de compostos potencialmente inéditos (CRNKOVIC et al. 2018; HOU et al. 2012; KRUG et al. 2008).

A plataforma XCMS Online (<a href="https://xcmsonline.scripps.edu">https://xcmsonline.scripps.edu</a>) é uma plataforma informática em nuvem, desenhada para processar e visualizar dados de metabolômica não direcionada, obtidos por HPLC-HRMS. À diferença de outros programas (softwares), tem a vantagem de não requerer expertise em programação ou interfaces de linhas de comando para sua operação, tornando-a acessível para não especialistas (TAUTENHAHN, et al. 2012). A interface da plataforma XCMS Online permite realizar o fluxo de trabalho completo de metabolômica não-direcionada desde o processamento dos dados brutos, detecção das features, correção de tempos de retenção, alinhamento de picos, análises estatísticas univariadas ou multivariadas, até a anotação das features por integração com a base

de dados METLIN, em conjunto com uma interface interativa de visualização dos resultados (GOWDA et al. 2014) (Figura 1.13). A plataforma XCMS Online identifica *features* cuja intensidade relativa varia entre grupos de amostras dependendo do nível de significância estatística (*p-value*), mudança de intensidade entre os grupos (*fold change*), razão *m/z*, tempo de retenção e intensidade relativa, definidos pelo usuário (GOWDA et al. 2014).

Figura 1.13 — Fluxograma de trabalho na plataforma XCMS Online para a análise de dados de metabolômica não direcionada por LC-HRMS.



Fonte: adaptado de TAUTENHANH et al. 2012.

Anotar as *features* detectadas a partir somente de uma análise de MS¹ é muito difícil, devido à limitação de informações associadas à massa acurada ou à fórmula molecular de um determinado composto, uma vez que diferentes compostos podem apresentar propriedades muito similares ou até mesmo idênticas (no caso de compostos isoméricos). Além disso, a complexidade dos extratos, com centenas ou milhares de compostos que geram milhares de *features*, faz com que muitos dos metabólitos detectados não tenham dados de referência disponíveis e não seja possível sua identificação (VAN DER HOOFT et al. 2020).

A aquisição de espectros de massas de fragmentação MS/MS (tandem MS ou MS<sup>2</sup>) em análises metabolômicas não-direcionadas proporciona informações úteis para identificar metabólitos secundários. O *Molecular Networking* ou redes moleculares, é uma técnica computacional de espectrometria de massas, cada vez mais utilizada em química produtos naturais, que fornece uma visualização do

espaço químico detectado em experimentos de MS/MS (WANG et al. 2016; QUINN et al. 2017). As redes moleculares são organizadas em grupos de espectros de MS/MS, levando-se em conta a similaridade dos padrões de fragmentação sob a presunção de que moléculas estruturalmente relacionadas apresentam espectros de fragmentação MS/MS semelhantes (WANG et al. 2016).

As redes moleculares são criadas em três etapas principais, utilizando-se a plataforma online Global Natural Products Social Molecular Networking GNPS (<u>https://gnps.ucsd.edu</u>) (Figura 1.14). Primeiro a aquisição dos espectros de MS/MS, os quais são alinhados entre si estabelecendo um espectro de consenso para cada feature, o qual é representado como um nodo (node). Nodos que apresentam compostos de similaridade estrutural são conectados entre si por linhas (edges) cuja espessura é determinada por um valor paramétrico denominado cosine score, o qual indica o grau de similaridade entre os espectros, variando entre 0 (totalmente diferente) a 1 (completamente idêntico). Subsequentemente é realizada a comparação de cada espectro MS/MS consenso com librarias de espectros disponíveis na plataforma GNPS, objetivando identificar match dentro da rede molecular. As redes moleculares obtidas podem ser vistas e analisadas no visualizador on-line da plataforma ou outros softwares. O GNPS disponibiliza o depósito de dados públicos através do repositório MassIVE (Mass Spectrometry Virtual Environment), o qual possibilita a análise automática, desreplicação on-line e curadoria dos dados depositados de MS/MS (WANG et al. 2016).

MS/MS library spectra

Spectrum/node matches
(if available)

GNPS
spectral libraries

Surfactin C14

Molecular network
creation

Figura 1.14 — Representação esquemática da criação de redes moleculares na plataforma GNPS.

Fonte: adaptado de WANG et al. 2016.

Em estudo de uma coleção de 1000 bactérias de origem marinha, foi possível priorizar uma linhagem a qual foi crescida em meio de cultivo a partir do qual foram isoladas dois compostos inéditos, os ácidos maridricos A e B, além da anotação de 76 famílias moleculares, incluindo a valinomicina, actinomicina D e desferroxiamina E (FLOROS et al. 2106). Análises metabolômicas de LC-HRMS realizadas em conjunto com GNPS-Molecular Networking de dois morfotipos da bactéria Streptomyces sp. RB110, permitiram estabelecer claras diferenças metabólicas entre as linhagens, em decorrência da produção de derivados de griseorhodina e da termidomicina A (UM et al. 2021). A integração de análises de Molecular Networking com outras técnicas como RMN-1H permitiu a identificação direcionada das crisogeamidas A-G produzidas em cultura pelo fungo Penicillium chrysogenum isolado de um coral (HOU et al. 2019). A aplicação conjunta de técnicas genômicas e de Molecular Networking a um grupo de 35 linhagens de Salinispora, permitiram desenvolver um método efetivo para à rápida priorização linhagens promissórias, bem como a identificação de componentes do meio de cultivo, de compostos conhecidos e seus derivados (DUNCAN et al. 2015).

#### 2. JUSTIFICATIVA

O conhecimento sobre a abundância e diversidade da comunidade microbiana associada às esponjas marinhas revela padrões de especificidade e complexidade comparáveis à microbiota intestinal humana (HENTSCHEL et al. 2012). No caso de metabólitos secundários isolados a partir de esponjas marinhas, muitas vezes não se sabe com exatidão a origem biossintética destes compostos. O interesse pelo estudo químico do microbioma associado às esponjas têm aumentado nos últimos anos, devido à crescente evidência da produção microbiana de metabólitos comumente encontrados em esponjas. Dado o enorme potencial genético que as bactérias possuem para a produção de metabólitos secundários, o isolamento e cultura de bactérias associadas às esponjas marinhas expande consideravelmente a possibilidade de aplicações biotecnológicas destes metabólitos secundários, bem como da investigação da sua biossíntese (THISSERA et al. 2022).

Estudos sobre metabolismo secundário do microbiana cultivável de esponjas marinhas do litoral brasileiro têm sido desenvolvidos no grupo de pesquisa do Professor Dr. Roberto Berlinck há mais de uma década, com destacados resultados no isolamento de compostos inéditos biologicamente ativos, validando a importância do estudo químico destes sistemas pouco explorados (TRINDADE-SILVA et al. 2012; KOSSUGA et al. 2012; PASSARINI et al. 2013; TRINDADE-SILVA et al. 2013; RUA et al. 2014; IÓCA et al. 2016; NICACIO et al. 2017; IÓCA et al. 2021).

As linhagens bacterianas estudadas neste projeto são isoladas da esponja marinha *Tedania brasiliensis*, da qual a investigação do metabolismo secundário foi realizada pela ex-aluna de doutorado do Professor Dr. Roberto Berlinck, Dra. Lizbeth Lorena L. Parra. A Dra. Parra isolou uma série de derivados da pseudoceratidina a partir do extrato MeOH desta esponja, os quais apresentaram potente atividade anti-leishmania e anti-*Tripanosoma cruzi* (PARRA et al. 2018).

Levando-se em conta que a pseudoceratidina e seus derivados são alcalóides pirrólicos polibromados, levanta-se a seguinte questão: os alcalóides bromopirrólicos isolados de *T. brasiliensis* são produzidos pela esponja ou por algum microorganismo associado? O desenvolvimento deste projetivo objetivou, fazendo uso de

abordagens dependentes de cultivo, abordar esta pergunta de maneira a se verificar se estes compostos são produzidos por bactérias cultiváveis. Caso não fossem, alternativamente objetivou-se fazer um estudo do metabolismo secundário das bactérias isoladas de *T. brasiliensis* expandindo o conhecimento da natureza deste microbioma e sua expressão metabólica, contribuindo por sua vez à ampliação dos estudos de bioprospecção da biodiversidade marinha brasileira.

#### 3. OBJETIVOS

O objetivo deste projeto é isolar e identificar bactérias aeróbias associadas à esponja *Tedania brasiliensis*, bem como caracterizar o perfil químico de culturas das linhagens isoladas com o intuito de identificar eventual(ais) micro-organismo(s) produtor(es) dos derivados da pseudoceratidina previamente isolados de *T. brasiliensis*.

### Objetivos específicos:

- Isolar e identificar bactérias associadas à esponja marinha *T. brasiliensis*;
- Desenvolver metodologias de cultivo destas bactérias, bem como de produção de seus metabólitos secundários;
- Avaliar o perfil químico das linhagens isoladas por HPLC-DAD-ELDS-MS e por UPLC-MS/MS, de maneira a se verificar a eventual produção de derivados da pseudoceratidina, bem como de outros metabólitos secundários;
- Otimizar a produção de derivados da pseudoceratidina (se produzidos) ou de outros metabólitos secundários, por bactérias produtoras em condições artificias de cultivo;
- Realizar a identificação completa de metabólitos secundários produzidos,
   principalmente no caso de metabólitos estruturalmente inéditos;
- Se isolados em quantidade suficiente, submeter metabólitos inéditos produzidos por bactérias de *T. brasiliensis* a testes de atividade biológica antileishmania, antiplasmodial, citotóxica e antibacterial.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

## 4.1 Procedimentos experimentais gerais

#### 4.1.1 Análises por HPLC-DAD-ELSD-MS

Análises por HPLC-DAD-ELSD-MS foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) modelo Waters Alliance 2695 acoplado sequencialmente a um detector UV-Vis de arranjo de diodos (DAD) Waters 2996, um detector de espalhamento de luz evaporativo (ELSD) Waters 2424 e um espectrômetro de massas (MS) de baixa resolução Waters Micromass ZQ 2000 com interface de ionização por electrospray (ESI) e analisador de simples quadrupolo, todos dispositivos operados pelo software Empower 2.0. As análises cromatográficas foram realizadas utilizando-se uma coluna Waters X-Terra® C18 (4,6 × 250 mm; 5 μm), e fase móvel em modo gradiente de H<sub>2</sub>O/MeOH/MeCN 90:5:5 acidificada com 0,1% de ácido fórmico até MeOH/MeCN 50:50 acidificada com 0,1% de ácido fórmico em 18 minutos, mantido até os 22 minutos, e finalmente recondicionamento da coluna de 23 até 30 minutos. A vazão foi de 1,0 mL/min. O volume de injeção foi de 10 μL de soluções de 2 mg/mL. O detector de DAD foi ajustado para detecção na faixa de cumprimento de onda entre 190 e 600 nm. O ELSD operou-se com ganho de 100, nebulizador em modo de aquecimento em nível 60%, drift tube com temperatura de 80 ± 5 °C, pressão do gás N<sub>2</sub> de 50 psi e *output full scale* de 2000 mV. O espectrômetro de massas foi utilizado nas seguintes condições: voltagem do capilar de 3,00 kV, temperatura da fonte 100 °C, temperatura de dessolvatação de 350 °C, vazão do gás do cone de 50 L/h, vazão do gás de dessolvatação de 350 L/h, detecção nos modos positivo e negativo na faixa de 100-1500 Da, e modo de aquisição de cromatogramas de íons totais (TIC).

#### 4.1.2 Condições gerais de análise por UPLC-HRMS

As análises por espectrometria de massas de alta resolução (HRMS) foram realizadas em um cromatógrafo líquido de ultra alta eficiência (UPLC) Waters Acquity UPLC-H-Class, acoplado com um espectrômetro de massas Waters Xevo G2-XS QToF com interface ESI, operado pelo software MassLynx 4.1. Utilizou-se uma solução de leucina-encefalina (Sigma®) de 200 pg/mL para calibração interna com

vazão de 10 μL/min infundida pela sonda do lockmass. A interface ESI foi ajustada nas seguintes condições: voltagem do capilar de 1,2 kV, voltagem do cone de 30 V, temperatura da fonte de 100 °C, temperatura de dessolvatação de 450 °C, vazão do gás do cone de 50 L/h e vazão do gás de dessolvatação de 750 L/h. A coluna cromatográfica foi mantida a 40 °C e as amostras a 15 °C. As condições de separação bem como o modo de aquisição dos dados foram estabelecidas para cada caso em particular e são descritas na correspondente seção de materiais e métodos de cada um dos capítulos.

## 4.1.3 Cromatografía líquida de alta eficiência

Separações por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em escala analítica e semipreparativa foram realizadas em um cromatógrafo equipado com um sistema quaternário de bombas Waters 2535, um detector UV-Vis de duplo feixe modelo Waters 2489 e um detector ELSD modelo Waters 2424, operado pelo software Empower 3.0.

#### 4.1.4 Ressonância magnética nuclear

Análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram levados a cabo utilizando-se um espectrômetro Bruker AVANCE III (14,1 T), operando em 600 MHz na frequência do hidrogênio (¹H) e 150 MHz na frequência do carbono-13 (¹³C) do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (DQ-UFSCar). As amostras foram preparadas em solventes deuterados (Cambridge Isotopes Laboratories Inc.) empregando o sinal residual do solvente como padrão interno. Os dados foram processados pelo software TopSpin 4.1.0.

#### 4.1.5 Solventes, reagentes e meios de cultivo

Os solventes utilizados nos procedimentos de extração dos meios de cultivo, extração e limpeza das resinas foram de grau analítico Synth®. Para as separações cromatográficas (exclusão por tamanho, cromatografía em coluna, extração em fase sólida e HPLC) os solventes empregados foram de grau HPLC LiChrosolv® e Riedel-de-Haën®. A água utilizada foi deionizada e purificada em um sistema Milli-Q Millipore equipado com uma resina de troca iônica e filtro biológico. Os solventes

utilizados para análises por UPLC-HRMS foram grau de MS LiChrosolv®. Para o preparo dos meios de cultivo e lavagem das resinas foi utilizada água destilada por um sistema de osmose reversa TE-4007-10 da Tecnal. Os meios Marine Agar 2216 e Marine Broth 2216 foram da Difco™. Os meios de cultivo A1-modificado (ZHANG et al. 2019), AM3 (ZHANG et al. 2016a), ASW-A (ZHANG et al. 2016b) e YEME (HONG et al. 2019) foram preparados com reagentes das marcas Acumedia, Synth e Himedia.

## 4.1.6 Condicionamento e limpeza das resinas de extração

Para a extração dos meios de cultivo foi utilizada uma mistura de resinas Amberlite® XAD-2 (Supelco®), XAD-4 (Sigma-Aldrich®) e XAD-7HP (Sigma-Aldrich®) na proporção 1:1:1. Antes de serem utilizadas, as resinas foram limpas de acordo com o seguinte protocolo: i) lavadas duas vezes com MeOH por 30 minutos em banho de ultra-som; ii) lavadas com acetona duas vezes durante 30 minutos em banho de ultra-som; iii) secas em estufa por uma noite; iv) hidratadas com água Milli-Q e armazenadas em geladeira. Após serem utilizadas, a mistura de resinas foi limpa com o seguinte protocolo: i) fervida em MeOH por 1 hora; ii) fervida em solução de NaOH 0,2 M por 1 hora; iii) fervida em solução de HCl 0,2 M por 1 hora; iv) lavada com água destilada até atingir pH neutro; v) lavada com MeOH; vi) lavada com acetona; vii) secas em estufa por uma noite; viii) hidratadas com água Milli-Q e armazenadas em geladeira. Entre cada etapa a mistura de resinas foi filtrada à vácuo através de funil Büchner com papel de filtro e o filtrado foi devidamente descartado.

No caso da resina Diaion® HP-20 (Sigma-Aldrich®), esta foi limpa duas vezes com dois volumes de MeOH em banho de ultra-som por 30 minutos e posteriormente lavada com igual quantidade de água Milli-Q em banho de ultra-som por 30 minutos cada para retirar o solvente orgânico, e por último hidratada com água Milli-Q por uma noite antes do uso.

#### 4.2 Coleta da esponja marinha Tedania brasiliensis

Amostras da esponja marinha *Tedania brasiliensis* foram coletadas em Arraial do Cabo-RJ, em janeiro de 2017 pelo Professor Eduardo Hajdu do Museu Nacional

da Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ por meio de mergulho autônomo a profundidade entre 9 m e 38 m. As amostras da esponja foram colocadas em um recipiente com água do mar natural estéril e refrigeradas até a chegada em laboratório para manter sua integridade. Em seguidas foram congeladas em nitrogênio líquido e despachadas em gelo seco para o laboratório do Prof. Roberto Berlinck (IQSC-USP).

## 4.3 Isolamento, cultivo e preservação das bactérias associadas à esponja marinha *T. brasiliensis*

Fragmentos de tecidos das amostras de *T. brasiliensis* foram descongelados e lavados com água do mar artificial estéril para retirar epibiontes, cortados e triturados com pinça esterilizada para a liberação dos micro-organismos associados. Os tecidos foram homogeneizados em solução de água do mar artificial estéril com um vórtex durante aproximadamente três minutos, obtendo-se uma solução chamada de 10°, a qual foi submetida a diluições seriadas de 10°1, 10°2, 10°3 e 10°4. Alíquotas de 100 μL dessas soluções foram plaqueadas em placas de ágar marinho (*Marine Agar* 2216, Difco<sup>TM</sup>-MA) e incubadas à 28 °C durante 3 dias. As colônias de bactérias obtidas foram selecionadas e estriadas várias vezes até se obter culturas puras. As culturas puras foram posteriormente preservadas à -80 °C em meio marinho (*Marine Broth* 2216, Difco<sup>TM</sup>-MB) com 20% de glicerol.

#### 4.4 Crescimento em escala analítica e extração do meio de cultivo

Duas metodologias de crescimento e extração foram testadas com o objetivo de se determinar o modo mais adequado de produção e extração dos metabólitos do meio de cultivo. Linhagens puras das bactérias isoladas foram reativadas a partir dos criotubos de preservação em placas de MA durante dois dias à 28 °C. Posteriormente, colônias individuais foram inoculadas em 50 mL de meio MB em frascos Schott de 250 mL, sob agitação de 160 rpm à 28 °C durante três dias, para se obter o pré-inóculo. Depois da obtenção do pré-inóculo foram avaliadas as seguintes metodologias simultaneamente:

a) 100 mL de meio MB foram inoculados com 1 mL do pré-inóculo e 10 g da mistura das resinas XAD-2, XAD-4 e XAD-7HP na proporção 1:1:1, sob agitação de 160

rpm à 28 °C durante 7 dias. Depois do período de crescimento, o meio de cultivo e as resinas foram filtrados à vácuo por funil Büchner. A mistura das resinas foi lavada com água destilada para retirar sais e outros componentes do meio de cultivo. A mistura das resinas foi em seguida extraída com MeOH (50 mL, 4x) e acetona (50 mL, 4x). Os extratos orgânicos foram combinados, secos em rota evaporador, pesados e armazenados em geladeira;

b) 100 mL de meio MB foram inoculados com 1 mL do pré-inóculo sob agitação de 160 rpm à 28 °C. Depois de 7 dias de crescimento, 10 g da mistura 1:1:1 das resinas XAD-2, XAD-4 e XAD-7HP foram adicionados ao meio de cultivo e deixados sob agitação a 160 rpm durante uma noite. Posteriormente, o meio de cultivo e mistura das resinas foram filtrados à vácuo em funil Büchner. A mistura das resinas foi lavada com água destilada para retirar sais e outros componentes do meio e extraída com MeOH (50 mL, 4x) e acetona (50 mL, 4x). Os extratos orgânicos foram secos em rota evaporador, pesados e armazenados em geladeira.

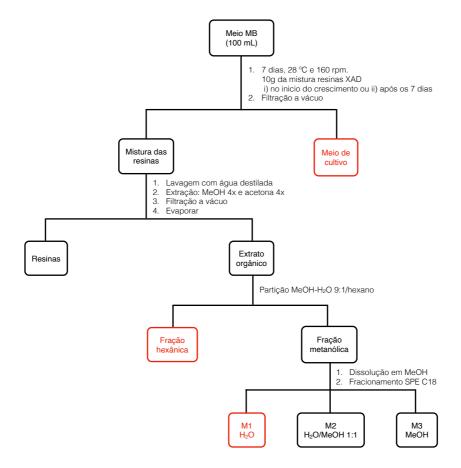
Os dois procedimentos foram também realizados em frascos Schott com meio MB sem inoculação de bactérias, com o intuito de se obter os respectivos controles negativos do meio de cultivo, e foram submetidos aos mesmos procedimentos de fracionamento e análise.

#### 4.5 Fracionamento dos extratos

Para os dois métodos de extração avaliados, o fracionamento dos extratos obtidos a partir do meio de cultivo de cada linhagem bacteriana seguiu o seguinte protocolo. Os extratos orgânicos foram particionados entre MeOH/H<sub>2</sub>O 9:1 e hexano para serem desengordurados. A fração hexânica foi descartada e a fração MeOH foi redissolvida em quantidade mínima de MeOH, solução à qual foi adicionada Celite® até formar uma pasta homogênea. A suspensão fração MeOH + Celite foi seca em rotaevaporador e posteriormente aplicada em cartuchos de extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction* SPE) de fase reversa C18 de 1 g, 2 g e 5 g. Os cartuchos foram eluídos com um gradiente de H<sub>2</sub>O/MeOH 1:0, 1:1 e 0:1, obtendo-se três frações chamadas de M1, M2 e M3, respectivamente. A fração M1 foi descartada, e

as frações M2 e M3 foram secas e armazenadas em geladeira para posterior análise por UPLC-MS/MS (Figura 4.1).

Figura 4.1 — Fluxograma de extração e fracionamento dos extratos das bactérias isoladas da esponja marinha *T. brasiliensis*.



As frações descartadas estão indicadas na cor vermelha.

Fonte: autoria própria.

### 4.6 Análises das frações dos extratos por UPLC-MS/MS

Prepararam-se em MeOH grau MS, 1 mL de soluções na concentração de 2,0 mg/mL das frações M2 e M3, obtidas como descrito no ítem anterior. As condições gerais das análises por UPLC-HRMS foram as descritas na seção 4.1.2 Adicionalmente, utilizou-se uma coluna Acquity Waters® UPLC BEH C18 (100 × 2,1 mm; 1,7 μm) e fase móvel constituída por H<sub>2</sub>O/MeCN (0,1% de ácido. fórmico), modo gradiente de 90:10 até 5:95 em 8 minutos, mantido 5:95 até o minuto 9, voltando a 90:10 em 9,1 minutos para acondicionamento da coluna até os 10

minutos, na vazão de 0,500 mL/min. O volume de injeção utilizado foi de 10,0 μL. A coluna foi mantida a 40 °C, enquanto as amostras foram mantidas a 15 °C. Os espectros de massas foram adquiridos em modo DDA (*Data Dependent Acquisition*) nos modos positivo e resolução, de 0 a 10 minutos, no intervalo de massas *m/z* 100-1500 Da, e um *scan time* de 0,2 s. Foram selecionados os 5 íons mais intensos de cada MS *survey*, a taxa de *scan* para MS/MS foi de 0,2 s<sup>-1</sup> e empregou-se uma exclusão dinâmica de picos de 5 s ou 10 mDa. Para a fragmentação dos íons selecionados, foi utilizada energia de colisão com rampa de LM CE de 6-9 V e de HM CE de 60-80 V.

A interpretação dos dados de UPLC-MS/MS foi baseada primeiramente na busca de compostos bromados, os quais são facilmente identificáveis pelo padrão de distribuição isotópico característico do bromo observado em espectrometria de massas. Posteriormente, a análise dos dados foi focada na observação dos perfis químicos das frações por comparação com os controles negativos, subtraindo os componentes do meio de cultivo e identificando picos correspondentes a metabólitos produzidos pelas bactérias. Os picos identificados foram submetidos a desreplicação na base de dados de *Dictionary of Natural Products*. Tendo em conta tanto os resultados da desreplicação que forneceram o menor número de hits, quanto a diversidade do perfil cromatográfico que mostrara a presença de picos diferentes do meio de cultivo, foram selecionadas três bactérias para o posterior estudo químico detalhado.

#### 4.7 Crescimento em maior escala das linhagens selecionadas

Duas das três linhagens selecionadas foram crescidas em escala de 60 L cada uma, em meio MB de acordo com a metodologia descrita na seção 4.4 item a. A obtenção do extrato foi feita conforme a metodologia indicada na figura 4.1, empregando-se na extração da resina 1 L x 4 vezes de MeOH e acetona cada um. Os extratos orgânicos foram secos em rota evaporador e posteriormente particionados entre MeOH/H<sub>2</sub>O 9:1 e hexano para serem desengordurados. Os extratos metanólicos foram secos em rota evaporador, pesados e armazenados em geladeira a 4 °C.

## 4.7.1 Estudo químico da linhagem Vibrio sp. J17

O extrato metanólico J17-M (7,4774 g) foi submetido a um fracionamento em coluna flash de fase reversa C18 com um gradiente sequencial de MeOH em água (0% até 100%) obtendo-se 11 frações, J17-M1 a J17-M11. A fração J17-M8 (154,1 mg), foi fracionada por cromatografia de exclusão por tamanho em Sephadex® LH-20 eluída com MeOH, obtendo-se 18 frações J17-M8A a J17-M8R. As frações J17-M8D (62,3 mg) e J17-M8E (8,3 mg) foram separadas por HPLC empregando-se uma coluna InertSustain® C8 (10 × 250 mm; 5 µm) e uma fase móvel de H₂O/MeOH/ MeCN 42:28:30 em modo isocrático com uma vazão de 4 mL/min e detector ELSD, obtendo-se as frações J17-M8D1 a J17-M8D7, e J17-M8E1 a J17-M8E7, respectivamente. As frações J17-M8D3 (2,6 mg) e J17-M8E2 (0,8 mg) foram reunidas e chamada de J17-M8DE32, bem como as frações J17-M8D5 (3,4 mg) e J17-M8E4 (0,8 mg) e chamada de J17-M8DE54. Ambas frações foram novamente purificadas separadamente por HPLC empregando-se uma coluna InertSustain® C8 (4,6 × 250 mm; 5 μm), uma fase móvel de H<sub>2</sub>O/MeOH/MeCN 33:66:1, vazão de 1 mL/min e detecção a 220 nm, obtendo-se os compostos J17-C1 (0,3 mg) e J17-C2 (0,2 mg).

#### 4.7.2 Estudo químico da linhagem Ruegeria sp. J49

O extrato metanólico J49-M (6,6486 g) foi submetido a um fracionamento em coluna flash de fase reversa C18 com um gradiente sequencial de MeOH em água (0% até 100%) obtendo-se as frações J19-M1 a J19-M11. As frações J49-M3 (732,0 mg) e J49-M4 (685,2 mg) foram fracionadas cada uma por cromatografia de exclusão por tamanho em Sephadex® LH-20 empregando-se como fase móvel H<sub>2</sub>O/MeOH 1:1, obtendo-se as frações J49-M3A a J49-M3L e J49-M4A a J49-M4I, respectivamente. As frações foram analisadas por HPLC-DAD-ELSD-MS com o intuito de identificar as frações de interesse e continuar com o processo de purificação. As frações selecionadas foram submetidas a várias etapas de HPLC, empregando-se primeiro uma coluna InertSustain® C18 e fase móvel misturas de H<sub>2</sub>O/MeOH/MeCN com 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA), e finalmente uma coluna Waters-XBridge® BEH Amide e como fase móvel misturas de H<sub>2</sub>O/MeCN com 0,1% de TFA.

# 4.8 Classificação taxonômica das linhagens J15, J17 e J49 selecionadas para estudo químico

A identificação taxonômica das três bactérias selecionadas para os estudos químicos foi realizada através do sequenciamento do gene 16S rRNA. O DNA foi extraído com a metodologia do kit de extração Qiagen® DNeasy® Plant Mini, de acordo com as instruções do fabricante. As condições da PCR foram realizadas de acordo com o protocolo descrito por Chimetto et al. (2009). Os produtos foram purificados com ExoSAP-IT™ Affymetrix™ e sequenciados com o kit BigDye™ Terminator v3.1 da Applied Biosystems™, seguindo as instruções do fabricante. A separação dos fragmentos de DNA foi realizada no analisador Genetic Analyzer 3500 da Applied Biosystems™. Os dados brutos do sequenciamento foram transferidos para o módulo construtor de genes ChromasPro 1.4 da Technelysium Pty. Ltd., onde as sequências de consenso foram determinadas. O ClustalW foi empregado para o alinhamento das sequências, e as matrizes de similaridade e as árvores filogenéticas foram construídas usando MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013). As árvores foram reconstruídas usando o método Neighbor-Joining (SAITOU e NEI, 1987). A robustez de cada topologia foi verificada por 1000 replicações de *bootstrap*. O sequenciamento e os experimentos de PCR foram realizados pelo aluno de doutorado Gustavo P. R. De Azevedo do laboratório do Prof. Fabiano L. Thompson da UFRJ. A análise dos dados foi realizada pela Dra. Luciane A. Chimetto Tonon do laboratório do Prof. Roberto G. S. Berlinck.

# 4.9 Sequenciamento e análise dos genomas das bactérias *Vibrio* sp. J17 e *Ruegeria* sp. J49

#### 4.9.1 Isolamento do DNA

As linhagens J17 *Vibrio* sp. e J49 *Ruegeria* sp. foram reativadas dos criotubos de preservação e crescidos por 3 dias à 28 °C em placas de MA. O DNA foi extraído com o kit de purificação de DNA genômico Wizard® da Promega. Brevemente, as células foram coletadas com ajuda de uma alça estéril descartável e colocadas em um eppendorf livre de DNase. As células foram tratadas com 600 µL da solução de lise nuclear, resuspensas cuidadosamente com a pipeta e incubadas à 80 °C por 5

minutos e depois esfriadas até temperatura ambiente. O lisado celular foi tratado com 3  $\mu$ L da solução de RNase à 37 °C por 60 minutos e depois com 200  $\mu$ L da solução de precipitação de proteínas em gelo por 5 minutos. A solução celular foi centrifugada a 15000 g por 3 minutos, o sobrenadante foi transferido para outro eppendorf com 600  $\mu$ L de isopropanol à temperatura ambiente para precipitar o DNA, o qual depois de centrifugado a 15000 g por 2 minutos, foi lavado com 600  $\mu$ L de etanol 70%. Uma vez retirado o etanol, 100  $\mu$ L de uma solução de reidratação de DNA foram adicionados ao pellet de DNA e incubado à 4 °C durante a noite. Por último, 10  $\mu$ L da solução de DNA foram aplicados em gel de agarose 1% em tampão tris-acetado-EDTA, corrido à 100 V por 1 hora, com padrão de DNA de 10-0,5 kb, com o intuito de avaliar a integridade do DNA.

## 4.9.2 Sequenciamento e análise dos genomas

O sequenciamento e montagem dos genomas foi realizado usando a plataforma de sequenciamento Illumina no centro de pesquisa em informática (Research Informatics Core) da Universidade de Illinois em Chicago (University of Illinois at Chicago, UIC). A anotação dos genomas montados foi realizada usando a anotação de gene automatizada utilizando o software Prokka (SEEMANN, 2014). Os agregados gênicos biossintéticos (BGCs, *Biosynthetic Gene Clusters*) presentes nos genomas foram identificados usando antiSMASH 4.0 (BLIN et al. 2017).

# 4.10 Abordagem metabolômica na investigação do metabolismo secundário de bactérias cultiváveis associadas à esponja marinha *Tedania brasiliensis*

### 4.10.1 Seleção das linhagens

Dentre 87 linhagens isoladas da esponja *T. brasiliensis*, 70 linhagens foram reativadas a partir dos cultivos preservados a -80 °C em placas de MA, A1-modificado [10 g de amido solúvel, 4 g de extrato de levedura, 2 de peptona, 1 g de CaCO<sub>3</sub> e 15 g de ágar em 1 L de água do mar artificial (30,0 g de NaCl; 9,68 g de MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O; 3,47 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 1,36 g de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O; 0,610 de KCl; 0,170 g de NaHCO<sub>3</sub>; 0,1 g de KBr; 0,030 g de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 0,040 g SrCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O; 0,140 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> em 1 L de água destilada)], AM3 (15 g de amido solúvel, 5 g de soja em pó, 15 g de

peptona, 15 g de glicerol, 2 g de CaCO<sub>3</sub> e 15 g de ágar em 1 L de água do mar artificial), ASW-A (20 g de amido solúvel, 10 g de glicose, 5 g de peptona, 5 g de extrato de levedura, 5 g de CaCO<sub>3</sub> e 15 g de ágar em 1 L de água do mar artificial) e YEME (4 g de levedura, 4 g de glicose, 10 g de extrato de malte e 15 g de ágar em 1 L de água do mar artificial). Dentre as linhagens de bactérias reativadas, seis linhagens cresceram nos cinco meios empregados e foram selecionadas para posterior crescimento em pequena escala em todos os meios de cultivo definidos anteriormente.

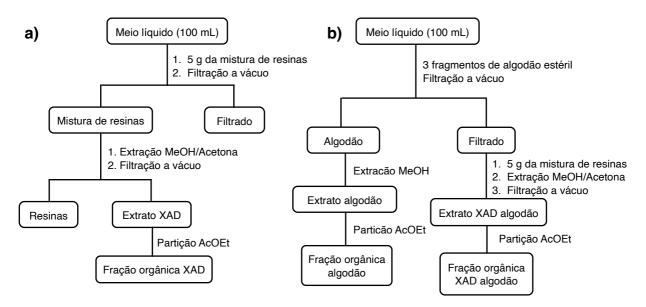
## 4.10.2 Crescimento e extração em pequena escala das linhagens selecionadas

Todos os experimentos foram realizados utilizando-se as seis linhagens seleccionadas. Estas foram reativadas a partir de seus criotubos de preservação em placas de MA e incubadas à 28 °C por 2 dias. Colônias individuais foram utilizadas para preparar os pré-inóculos em frascos Schott de 250 mL contendo 50 mL dos meios A1-modificado, AM3, ASW-A, MB e YEME, crescidos por 3 dias à 28 °C e sob agitação de 180 rpm. Uma alíquota de 1 mL de cada pré-inóculo foi inoculado em frascos Schott de 250 mL contendo 100 mL de cada meio e 5 g da mistura 1:1:1 das resinas XAD-2, XAD-4 e XAD-7. Em paralelo, 1 mL do pré-inóculo foi utilizado para inocular 100 mL de cada meio em frascos Schott de 250 mL contendo 3 fragmentos esféricos de algodão de aproximadamente 3 cm de diâmetro, previamente esterilizados. Todos cultivos foram incubados à 28 °C por 7 dias sob agitação de 180 rpm. Foram realizados experimentos de controle negativo de cada meio de cultivo nas duas condições de crescimento, XAD e algodão.

Os meios de cultivo com a mistura das resinas XAD foram filtrados através de papel de filtro em funil de Büchner. A mistura das resinas XAD foi recolhida após a filtração, lavada com água destilada e extraída com MeOH (4 x 50 mL) e acetona (4 x 50 mL). Os solventes orgânicos foram reunidos em uma única fração, a qual foi evaporada. O resíduo obtido foi particionado entre AcOEt e H<sub>2</sub>O (3 x 10 mL de cada solvente). A fração AcOEt separada, evaporada, seca com sulfato de magnésio anidro, filtrada e evaporada até a secura. Para os cultivos das linhagens de bactérias com algodão no meio de cultivo, os fragmentos de algodão foram retirados do meio de cultivo por filtração através de papel de filtro em funil de Büchner. Os fragmentos

de algodão foram subsequentemente extraídos com MeOH (3 x 100 mL) em ultrassom por 20 minutos. Após a filtração para recuperação dos fragmentos de algodão, a cada meio de cultivo foram adicionados 5 g da mistura 1:1:1 das resinas XAD-2, XAD-4 e XAD-7. A mistura meio de crescimento + resinas XAD foi agitada durante uma noite a 180 rpm. Após este período a mistura das resinas foi extraída como indicado anteriormente. A aplicação deste protocolo levou à obtenção de um total de 105 extratos. O procedimento de geração destes extratos está ilustrado na figura 4.2.

Figura 4.2— Procedimentos de crescimento e extração das linhagens de bacterias isoladas de *T. brasiliensis* selecionadas para o estudo metabolômico. a) crescimento com a mistura das resinas XAD. b) crescimento com fragmentos de algodão.



Fonte: autoria própria.

#### 4.10.3 Análises por UPLC-HRMS

Os extratos e frações obtidos como descrito no ítem anterior foram dissolvidos em MeOH a uma concentração de 2 mg/mL e filtrados através de membranas de 0,2 µm para a remoção de sólidos insolúveis. Todas as análises foram realizadas em triplicata técnica. As análises por espectrometria de massas foram realizadas em um espectrômetro de massas de Quadrupolo-Tempo de Vôo (Waters® Xevo® QToF) com interface de electrospray (ESI), acoplado com um cromatógrafo líquido de ultra alta eficiência (Waters® Acquity UPLC H-class)

equipado com uma coluna de fase reversa (Waters® Acquity UPLC BEH C18, 2,1 x 100 mm, 1,7 μm). Empregou-se um gradiente de H<sub>2</sub>O/MeCN (ambos com 0,1% de ácido fórmico) de 90:10 até 5:95 em 8 minutos, mantido em 5:95 por 1 minuto, voltando a 90:10 em 0,1 minutos para acondicionar a coluna por 0,9 min para a injeção seguinte, com uma vazão de 0,500 mL/min. A coluna foi mantida a uma temperatura de 40 °C, enquanto as amostras foram mantidas a 15 °C. O volume de injeção utilizado foi de 10 μL. Os dados de MS/MS foram adquiridos no modo Data Dependent Acquisition (DDA) com os seguintes parâmetros: seleção dos 3 íons mais intensos, taxa de scan para MS/MS de 0,2 s<sup>-1</sup>, exclusão dinâmica de picos de 5 s ou 10 mDa, energia de colisão MS/MS com rampa LM CE de 6-9 V e rampa HM CE 60-80 V. Os espectros de massas foram adquiridos nos modos positivo e resolução, em dois eventos de scan de massas, o primeiro de 100 a 600 Da e o segundo de 500 a 2000 Da, com um scan time de 0,2 s-1. A fonte de ionização foi operada nas seguintes condições: voltagem do capilar de 1,2 kV, voltagem do cone de 30 V, temperatura da fonte de 100 °C, temperatura de dessolvatação de 450 °C, vazão do gás no cone de 50 L/h e vazão do gás de dessolvatação de 750 L/h. Para calibração interna utilizou-se uma solução de leucina-encefalina (Sigma-Aldrich) 200 pg/mL, infundida pela sonda do *lock-mass* com vazão de 10,0 μL/min.

#### 4.10.4 Análises de metabolômica na plataforma XCMS Online

Dados brutos (.raw) das análises por UPLC-HRMS foram convertidos ao formato .mzXML utilizando-se o software MSConvert e depois importados na plataforma do XCMS Online (https://xcmsonline.scripps.edu, Scripps Center for Metabolomics, La Jolla, CA, USA). Os dados foram processados com os seguintes parâmetros: feature detection: *centroid wave*, ppm: 10, *minimum peak width*: 2s, *maximum peak width*: 25s, mzdiff: 0,01, *signal/noise threshold*: 10, prefilter peaks: 3, *prefilter intensity*: 100000; *retention time correction*: obiwarp, *profStep*: 0,5; *alignment: mzwid*: 0,01, *minfrac*: 0,5, bw: 2; *statistics*: unpaired parametric t test (Welch t test), *p-value threshold*: 0,05, *fold change threshold*: 1,5.

#### 4.10.5 Análises de redes moleculares

Os dados brutos de MS/MS foram convertidos do formato .raw ao formato .mzXML com o software MSConvert. As redes moleculares foram geradas na plataforma online *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS), utilizando-se o protocolo de redes moleculares clássicas (ARON et al. 2020). O algoritmo MS-Clustering foi ativado para a geração dos espectros consenso. A tolerância dos íons pai e os íons fragmento foi ajustada a 0,02 Da tanto para a criação das redes moleculares quanto para a desreplicação nas bases de dados da plataforma de GNPS. Adicionalmente, o valor mínimo de cosseno foi de 0,7, o valor *Network* TopK foi de 10, o número mínimo de íons fragmento combinados foi de 4, e o tamanho mínimo do cluster foi de 4. Configurações padrão foram utilizadas para os outros parâmetros, de acordo à plataforma de GNPS. O software Cytoscape 3.7.0 foi utilizado para a geração e visualização das redes moleculares obtidas.

## 4.10.6 Classificação taxonômica da linhagem J55

A identificação taxonômica da bactéria J55 foi realizada através do sequenciamento do gene 16S rRNA. A linhagem J55 foi reativada do criotubo de preservação e crescida por 2 dias à 28 °C em placas de MA, a partir das quais colônias individuais foram inoculadas em meio MB e crescidas a 28 °C e 160 rpm. As células foram coletadas por centrifugação a 10,000 g e colocadas em um eppendorf livre de DNase. Foram adicionados 500 μL da solução tampão de lise celular de extração de DNA e incubados à 37 °C por uma hora. Posteriormente 250 μL de CHCl<sub>3</sub> e 250 μL de solução aquosa de fenol foram adicionados e centrifugados a 13,000 g por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida com cuidado para outro eppendorf com 250 μL de CHCl<sub>3</sub> e centrifugadas novamente a 13,000 g por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para outro eppendorf, foram adicionados 900 µL de i-PrOH e mantido em freezer à -20 °C por 1 hora para precipitar o DNA. Após centrifugação a 13,000 g por 10 minutos, a fração de DNA obtida foi lavada com 500 μL de EtOH 70%. Una vez retirado o EtOH, 100 μL de H<sub>2</sub>O Milli-Q autoclavada NDase free foram adicionados ao pellet de DNA. A qualidade do DNA obtido foi verificado por electroforese em gel de agarose 1%, com padrão de DNA de 10-0,5 kb. O crescimento, extração do DNA e análise dos

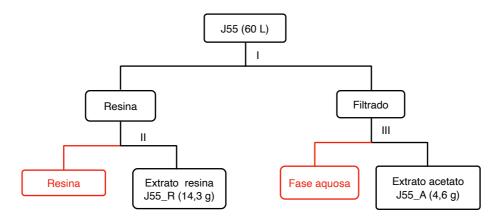
resultados foram realizados pela aluna de Doutorado Lamonielli F. Michaliski e pela aluna de Iniciação Científica Milenna Quatrochi do laboratório de Professor Dr. Roberto Berlinck. O sequenciamento foi realizado no cento de pesquisa em informática (Research Informatics Core) da Universidade de Illinois em Chicago (University of Illinois at Chicago, UIC).

## 4.10.7 Estudo químico da linhagem Microbacterium testaceum J55

## 4.10.7.1 Crescimento e extração

A linhagem *Microbacterium testaceum* J55 foi reativada a partir de criotubo de preservação em placas de Marine Ágar MA, durante 2 dias à 28 °C. Colônias individuais da bactéria foram inoculadas em 100 mL do meio YEME em frascos Schott de 250 mL, e crescidas durante 3 dias à 28 °C e 180 rpm de maneira a se obter o pré-inóculo da cultura. Alíquotas de 2 mL do pré-inóculo foram usadas para se inocular um total de 60 L do meio YEME em frascos Schott de 500 mL contendo 200 mL do meio com 5% de resina Diaion® HP-20, e agitados à 28 °C e 180 rpm. Após 7 dias de crescimento, o meio de cultivo e a resina foram separados por filtração em funil de Büchner. A resina foi primeira lavada com água destilada e posteriormente extraída com MeOH e acetona, 4 vezes com cada solvente. As fases orgânicas foram reunidas e evaporadas a vácuo, fornecendo 14,3 g do extrato da resina J55\_R. O meio de cultivo filtrado foi extraído com igual volume de AcOEt, o qual foi posteriormente evaporado fornecendo 4,6 g do extrato J55\_A (Figura 4.3).

Figura 4.3 — Procedimento de extração do cultivo em maior escala da linhagem bacteriana *Microbacterium testaceum* J55, isolada da esponja marinha *T. brasiliensis*.



Legenda: I — crescimento em meio líquido durante 7 dias, à temperatura de 28 °C, 180 rpm, contendo 5% resina HP-20; II — Extração da resina Diaion® HP-20 com MeOH/Acetona; III — Partição  $H_2O$ -MeOH 9:1 / AcOEt. As frações descartadas estão ressaltadas em vermelho. Fonte: autoria própria.

#### 4.10.7.2 Fracionamento e purificação

Ambos extratos orgânico (AcOEt) e da resina HP-20 (extraída com MeOH e acetona) obtidos a partir do meio de cultivo da linhagem *Microbacterium testaceum* J55, foram avaliados por UPLC-HRMS e HPLC-DAD-ELSD-MS. Os resultados obtidos indicaram perfis químicos similares. Desta forma, os extratos foram reunidos e nomeados J55\_X. O extrato J55\_X (18,9 g) foi fracionado por cromatografia em coluna aberta de fase reversa C18 (5 cm × 30 cm) eluída com um gradiente de H<sub>2</sub>O/MeOH 8:2 até MeOH 100%, obtendo-se 5 frações (J55\_X1 a J55\_X5). A fração J55\_X5 (1,0 g) foi fracionada por cromatografia de exclusão por tamanho em uma coluna de Sephadex® LH-20 (dimensões: 140 cm × 2,5 cm) eluída com MeOH, obtendo-se as frações J55\_X5A a J55\_X5H (Figura 4.4). Todas as frações obtidas foram analisadas por HPLC-DAD-ELSD-MS.

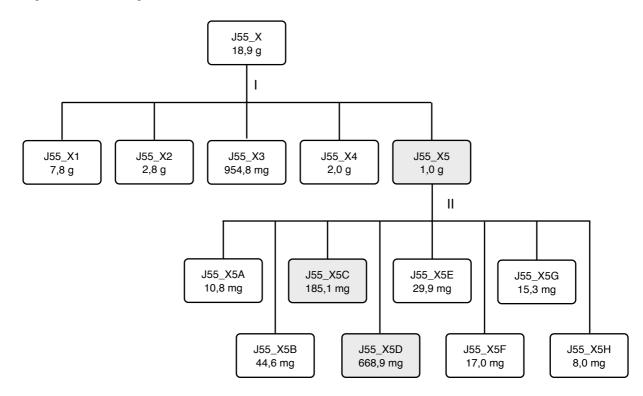


Figura 4.4 — Fluxograma do fracionamento do extrato J55\_X.

Legenda: I — Cromatografia em coluna aberta de fase reversa C18 eluída com  $H_2O$ -MeOH 8:2 (fração J55\_X1), 6:4 (fração J55\_X2), 4:6 (fração J55\_X3), 2:8 (fração J55\_X4) e MeOH 100% (fração J55\_X5); II — Cromatografia em coluna de Sephadex® LH-20 (dimensões: 140 cm × 2,5 cm) eluída com MeOH.

Fonte: autoria própria.

A fração J55\_X5C foi separada por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa (RP-HPLC), utilizando-se uma coluna semi-preparativa InertSustain® C18 (250 × 10 mm, 5 μm), eluída em modo isocrático com uma mistura de H<sub>2</sub>O-MeCN 47:53 (0,1% de ácido fórmico), com uma vazão de 4 mL/min e detecção por detector evaporativo de espalhamento de luz (*Evaporative Light Scattering Detector* ELSD). Desta separação foram obtidas as frações J55\_X5C1 a J55\_X5C8 (Figura 4.5).

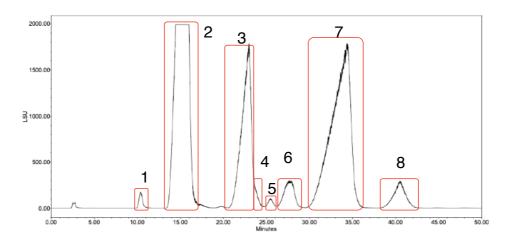


Figura 4.5— Cromatograma da separação por HPLC em fase reversa da fração J55\_X5C.

Fonte: autoria própria.

As análises por HPLC-UV-ELSD-MS das frações J55\_X5C2 (16,8 mg), J55\_X5C3 (2,5 mg), J55\_X5C7 (12,6 mg) e J55\_X5C8 (2,2 mg) indicaram grau de pureza satisfatório para serem analisadas por ressonância magnética nuclear RMN. Uma porção de 250 mg da fração J55\_X5D (668,9 mg) foi separada por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa (RP-HPLC), utilizando-se uma coluna semi-preparativa InertSustain® C18 (250 × 10 mm, 5 μm). A coluna foi eluída em modo isocrático com uma mistura de H<sub>2</sub>O-MeCN 18:82 (0,1% de ácido fórmico), com uma vazão de 4 mL/min e detecção por ELSD (Figura 4.6).

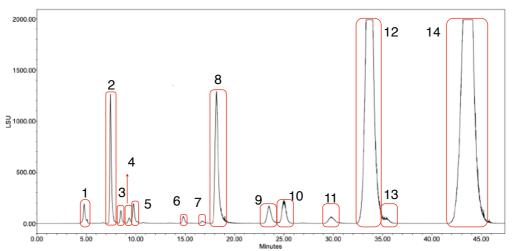


Figura 4.6 — Cromatograma da separação por HPLC em fase reversa da fração J55\_A4D.

Fonte: autoria própria.

As análises por HPLC-UV-ELSD-MS das frações J55\_X5D7 (7,2 mg), J55\_X5D8 (2,9 mg), J55\_X5D9 (34,8 mg), J55\_X5D11 (2,2 mg) e J55\_X5D12 (84,2 mg) também indicaram grau de pureza satisfatório para serem analisadas por ressonância magnética nuclear RMN.

As análises por HPLC-DAD-ESLD-MS indicaram que vários dos mesmos compostos haviam sido obtidos nas duas separações por HPLC. Desta maneira as seguintes frações foram reunidas: J55\_X5C2 e J55\_X5D2 e denominadas de J55\_C8; J55\_X5C3 e J55\_X5D3 e denominadas de J55\_C9; J55\_X5C7 e J55\_X5D6 e denominadas de J55\_C10; J55\_X5C8 e J55\_X5D8 e denominadas de J55\_C11. Uma vez reunidas, foram submetidas a análises por RMN mono e bidimensional, bem como de derivatização para determinar a configuração absoluta dos compostos isolados.

## 4.10.7.3 Determinação da configuração absoluta de resíduos de açúcares

## 4.10.7.3.1 Preparo dos derivados tiazolidina dos padrões de D-glicose e D-manose com cloridrato do éster metílico da L-cisteína.

Aproximadamente 2,0 mg de D-glicose e D-manose, e 4,0 mg do cloridrato do éster metílico da L-cisteína foram dissolvidos em 120  $\mu$ L de piridina- $d_5$ , colocados em tubos de RMN e aquecidos à 60 °C em banho de maria por uma hora. As reações de derivatização foram mantidas em repouso por uma noite à temperatura ambiente antes da aquisição dos espectros de <sup>1</sup>H-RMN de cada uma das amostras reacionais. Também foi preparado um tubo de RMN com uma mistura 1:1 dos padrões dos açúcares de de D-glicose e D-manose nas mesmas condições anteriormente descritas.

# 4.10.7.3.2 Preparo dos derivados de tiazolidina dos açúcares dos compostos isolados da linhagem J55

Aproximadamente 1,0 mg de cada um dos compostos isolados (J55\_C8, J55\_C9, J55\_C10 e J55\_C11) foi submetido à hidrólise ácida com ácido trifluoroacético (TFA) 2 M em solução aquosa à 100 °C por 8 horas. A mistura reacional foi evaporada a vácuo para se obter o hidrolisado. O hidrolisado foi

posteriormente redissolvido em 3 mL de água deionizada e particionado 3 vezes com 3 mL de CHCl<sub>3</sub>. A fase aquosa contendo a mistura dos açúcares foi separada, evaporada até a secura e colocada a reagir com 1,0 mg do cloridrato do éster metílico da L-cisteína em 120 μL de piridina- $d_5$ , segundo o procedimento descrito anteriormente, para a obtenção dos derivados de tiazolidina dos residuos de açúcares dos produtos naturais. A comparação dos espectros obtidos dos compostos com os dos padrões permitiu determinar a configuração absoluta dos resíduos de açúcar dos glicoglicerolipídeos isolados.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 5.1 Isolamento, crescimento e preservação das bactérias associadas à esponja *T. brasiliensis*

Foram recebidas três amostras de três espécimes da esponja *T. brasiliensis* etiquetadas como 21033, 21034 e 21035. Linhagens bacterianas foram isoladas e purificadas utilizando-se como critério a morfologia das colônias, nas condições de cultura em meio MA e a partir do cultivo primário. Foram obtidas 87 linhagens bacterianas, das quais 42 a partir da amostra de *T. brasiliensis* 21033, 25 da amostra de *T. brasiliensis* 21034 e 20 da amostra de *T. brasiliensis* 21035. A codificação das linhagens isoladas foi estabelecida de acordo com a ordem do isolamento, junto com a letra inicial J.

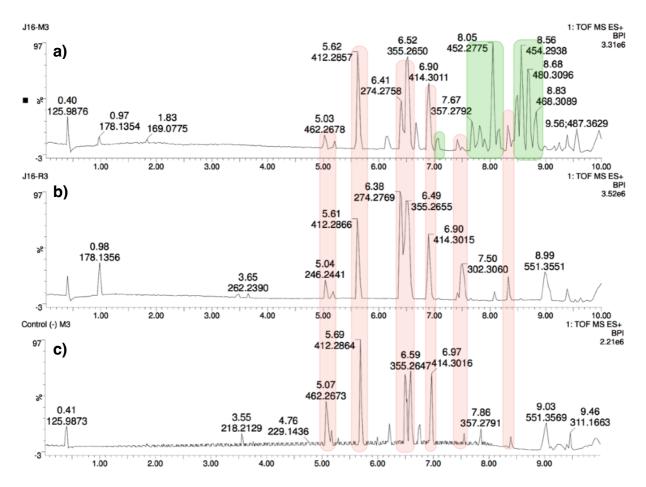
Ao final da etapa de purificação das linhagens, estas foram preservadas em criotubos contendo meio MB com 20% de glicerol sob -80 °C. Com o objetivo de garantir uma disponibilidade suficiente de cada linhagem, foi elaborado um banco de preservação em criotubos por quintuplicata de cada uma das 87 bactérias. Além disso, foi também preservada à temperatura de -80 °C uma pequena quantidade de massa de células para a posterior identificação molecular.

#### 5.2 Crescimento em escala analítica e extração do meio de cultivo

Objetivando se estabelecer as melhores condições de crescimento e extração dos metabólitos secundários produzidos pelas bactérias isoladas da esponja *T. brasiliensis*, foram realizados os ensaios descritos na seção 4.2.3, itens a e b, com uma amostra de 22 linhagens e um controle negativo. A comparação dos perfis cromatográficos de UPLC-HRMS dos extratos dos meios de cultivo das bactérias com o extrato do controle negativo, indicou dois aspectos importantes: i) o meio de cultivo é extraído sempre em maior proporção sem importar o tempo de extração da mistura das resinas, sendo um interferente importante nas análises por UPLC-HRMS; ii) os perfis cromatográficos que mostraram a maior diversidade química foram os dos extratos dos meios de cultivo obtidos com a resina colocada no início do crescimento das bactérias, como por exemplo no caso da bactéria J16 (Figura 5.1).

Devido à obtenção de extratos com maior diversidade química quando a misturas das resinas é adicionada desde o início da inoculação, a avaliação dos perfis químicos das bactérias foi realizada com esta metodologia.

Figura 5.1 — Cromatogramas de massas de alta resolução dos extratos do meio de cultivo da bactéria J16 obtidos pelas duas metodologias: a) perfil cromatográfico do extrato obtido com a adição da mistura das resinas XAD ao meio de cultivo no começo do crescimento; b) perfil cromatográfico do extrato obtido com a adição da mistura das resinas XAD ao meio de cultivo depois de 7 dias de crescimento; c) controle negativo do meio de cultivo com a adição da mistura das resinas XAD no início do crescimento.



Legenda: Sinais sombreados em vermelho correspondem aos componentes do meio de cultivo. Sinais sombreados em verde correspondem a compostos produzidos pela bactéria e que foram extraídos pela mistura de resinas XAD empregando a metodologia descrita no ítem 4.2.3 item a. Fonte: Autoria própria.

# 5.3 Análises por UPLC-MS/MS das frações dos extratos produzidos por bactérias isoladas de *Tedania brasiliensis*

Uma vez que o objetivo inicial do projeto era investigar a produção de alcalóides bromopirrólicos derivados da pseudoceratidina por bactérias isoladas da

esponja *T. brasiliensis*, foram realizadas análises por UPLC-MS/MS de frações dos extratos produzidos pelas bacterias isoladas da esponja de maneira a observar picos cromatográficos que apresentassem compostos bromados (que apresentam espectros de massas com padrão típico de distribuição isotópica).

A pseudoceratidina foi isolada inicialmente da esponja *Pseudoceratina purpurea* (TSUKAMOTO et al. 1996a; TSUKAMOTO et al. 1996b). O fato deste composto ter sido isolado de esponjas filogeneticamente distantes leva a considerar uma possível origem microbiana para o composto. Nesse sentido, no laboratório do Professor Roberto Berlinck investigou-se a origem biossintética desta molécula fazendo uso de análises metagenômicas da esponja *T. brasiliensis* na busca de genes codificantes de halogenases objetivando a identificação do micro-organismo produtor e a correspondente rota metabólica (RUA et al, 2018).

Os phyla/classe bacterianos mais abundantes encontrados no metagenoma da esponja foram *Proteobacteria* (*Alpha-*, *Gamma-* e *Beta*) junto com *Firmicutes*, *Deltaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Chlroflexi*, *Cyanobacteria*, *Bacteroidetes*, *Planctomycetes*, *Acidobacteria* e *Poribacteria* (Figura 5.2) (RUA et al, 2018). Quando comparado com o metagenoma de outras esponjas produtoras de bromopirróis, como *Agelas* app, encontrou-se que esses holobiontes (*T. brasiliensis* e *Agelas* spp.) não compartilham halogenases microbianas, o que sugere um padrão de distribuição específica de micro-organismos nestas esponjas, que se diferenciam umas das outras tanto pela composição da comunidade microbiana quanto pelos genes funcionais presentes em cada uma (RUA et al, 2018).

100.0 90.0 Verrucomicrobia 80.0 Poribacteria 70.0 Acidobacteria 60.0 Planctomycetes 50.0 Bacteroidetes 40.0 Cyanobacteria 30.0 Chloroflexi 20.0 Actinobacteria 10.0 Deltaproteobacteria asilerasilerisis / sp? Tedania AUS ■ Firmicutes Agelas sol Betaproteobacteria Gammaproteobacteria Alphaproteobacteria

Figura 5.2 — Abundância dos phyla/classe de bactérias presentes no metagenoma da esponja *Tedania brasiliensis*, esponjas produtoras de alcalóides bromopirrólicos (*Agelas* spp.) e esponjas não produtoras de bromopirróis (*Tedania* spp.).

Fonte: adaptado de RUA et al. 2018.

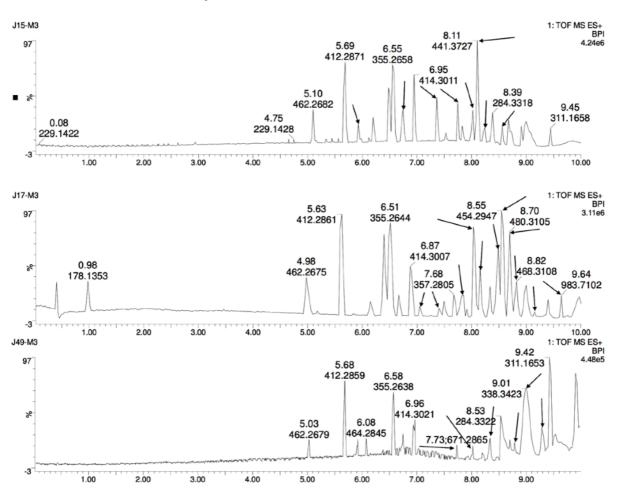
Sob as condições de crescimento e extração empregadas, não foi detectada a produção de nenhum composto bromado derivado da pseudoceratidina por nenhuma das linhagens de bactérias isoladas da esponja *T. brasiliensis*. Embora esse resultado não seja obviamente conclusivo, está em concordância com os mais recentes estudos que levantam a hipótese que as esponjas hospedeiras são as responsáveis pela biossíntese dos alcalóides pirról-imidazólicos (MOHANTY et al. 2020). Neste trabalho, os autores demonstraram em esponjas dos gêneros *Stylissa*, *Axinella* e *Agelas*, filogeneticamente diferentes e produtoras destes alcalóides, que a convergência metabolômica não implica a conservação de uma estrutura comum no microbioma que permita supor a presença de algum(ns) micro-organismos produtores destes compostos. Isso contrasta com as evidências nos casos de PNMs, cuja biossíntese tem-se comprovado ser de origem microbiana, onde a arquitetura dos microbiomas permanece relativamente conservada ao longo da filogenética dos hospedeiros (AGARWAL et al. 2017; DONIA et al. 2011). Resultados similares foram obtidos no estudo de esponjas produtoras de alcalóides derivados

da bromotirosina (MOHANTY et al.2021), suportando a hipótese que o microbioma não participa na produção destes compostos.

Devido à ausência de derivados bromados nos extratos dos meios de crescimento das bactérias, a análise dos dados foi encaminhada para a comparação manual dos perfis químicos (UPLC-HRMS) dos extratos versus os controles negativos do meio de cultivo, de maneira a se verificar a diversidade química produzida pelas bactérias em meio de cultivo. Observou-se a presença majoritária de vários componentes do meio de cultivo nas frações de todos os extratos analisados, evidenciando que o meio de cultivo seria um interferente importante no processo de purificação. Por outro lado, observou-se que os perfis químicos das frações eluídas com H<sub>2</sub>O/MeOH 1:1 foram idênticos aos controles negativos dessas mesmas frações. Já as frações eluídas com MeOH forneceram uma maior diversidade de picos cromatográficos diferenciáveis do meio de cultivo, ou seja, de compostos produzidos pelas bactérias.

A análise comparativa das frações metanólicas dos extratos dos meios de cultivo das bactérias, permitiu identificar 27 linhagens que apresentaram perfis cromatográficos interessantes pela presença de picos diferentes do meio de cultivo. Realizou-se a desreplicação dos espectros de massas dos picos cromatográficos de potenciais metabólitos secundários com a base de dados *Dictionary of Natural Products* (DNP), empregando os dados de espectrometria de massas de alta resolução. Levando-se em conta como critério de escolha os resultados da desreplicação que deram o menor número de *hits* na base de dados junto com a diversidade do perfil cromatográfico, foram selecionadas as linhagens bacterianas J15, J17 e J49 para posterior investigação química dos extratos de seus meios de cultura (Figura 5.3, Tabela 5.1).

Figura 5.3 — Cromatogramas de massas de alta resolução das frações metanólicas dos extratos das linhagens J15, J17 e J49. Os picos de interesse estão indicados com flechas e as respectivas massas exatas (em m/z) dos espectros de massas de cada um dos sinais cromatográficos. As condições de análise foram as descritas na seção 4.2.5.



Fonte: autoria própria.

Tabela 5.1 — Resultados da busca na base de dados DNP das três linhagens selecionadas com perfis químicos de destaque.

Bactéria	Massa acurada (m/z)	t <sub>R</sub> (min)	Massa exata (Da)	Número de compostos na base de dados DNP
	413,1795 [M+H] <sup>+</sup>	5,93	412,1717	45
	499,2150 [M+H] <sup>+</sup>	6,75	498,2072	9
J15	585,2532 [M+H] <sup>+</sup>	7,36	584,2454	9
	671,2898 [M+Na] <sup>+</sup>	7,75	648,3000	2
	757,3248 [M+Na] <sup>+</sup>	8,02	734,3350	1
	441,3727 [M+H] <sup>+</sup>	8,11	440,3649	375

		843,3604 [M+Na] <sup>+</sup>	8,24	820,3706	2
		1015,4362 [M+H] <sup>+</sup>	8,56	1014,4284	2
		452,2795 [M+H] <sup>+</sup>	8,03	451,2717	12
		452,2789 [M+H] <sup>+</sup>	8,16	451,2711	12
		454,2943 [M+H] <sup>+</sup>	8,49	453,2865	4
J17	14.7	454,2947 [M+H] <sup>+</sup>	8,55	453,2869	4
	JII	480,3105 [M+H] <sup>+</sup>	8,70	479,3027	3
		468,3108 [M+H] <sup>+</sup>	8,82	467,3030	6
		482,3254 [M+H] <sup>+</sup>	9,15	481,3176	3
		983,7102 [M+H] <sup>+</sup>	9,64	982,7024	0
		671,2865 [M+Na] <sup>+</sup>	7,73	648,2967	9
		757,3253 [M+Na] <sup>+</sup>	8,02	734,3355	1
J4		828,6063 [M+H] <sup>+</sup>	8,43	827,5985	0
	J49	338,3433 [M+H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	8,99	320,3328	0
		338,3423 [M+H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	9,01	320,3318	0
		533,2797 [M+H] <sup>+</sup>	9,18	532,2719	4
		659,4072 [M+H] <sup>+</sup>	9,53	658,3994	5

Fonte: autoria própria.

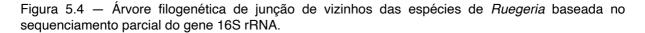
### 5.4 Classificação taxonômica das linhagens selecionadas

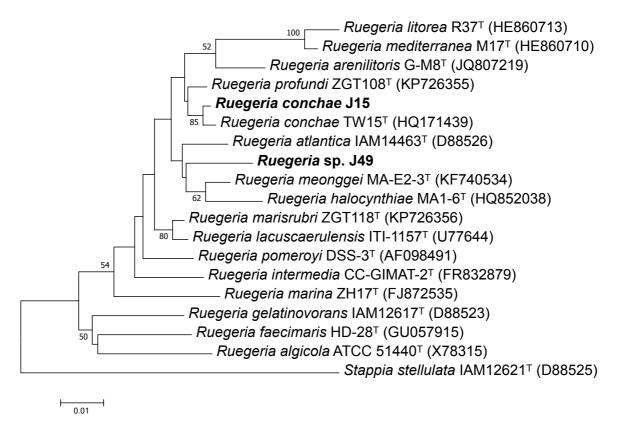
Os dados de sequenciamento do gene 16S das três linhagens selecionadas para o estudo químico mostraram os seguintes resultados com respeito à sua identificação taxonômica.

A linhagem J15 tem mais de 99% de similaridade do gene 16S com a espécie Ruegeria conchae. A linhagem J49 possui 97-98% de similaridade com as espécies Ruegeria atlantica e Ruegeria conchae, o que indica que se pode tratar de uma espécie nova. Porém, devido ao sequenciamento ser apenas de um parcial de menos da metade (700 pb) do gene 16S, não foi possível confirmar por completo sua taxonomia, sendo, portanto, necessário completar o sequenciamento do gene

para ter um maior grau de certeza na identificação. Na figura 5.4 apresenta-se a árvore filogenética das espécies de *Ruegeria* para as linhagens J15 e J49.

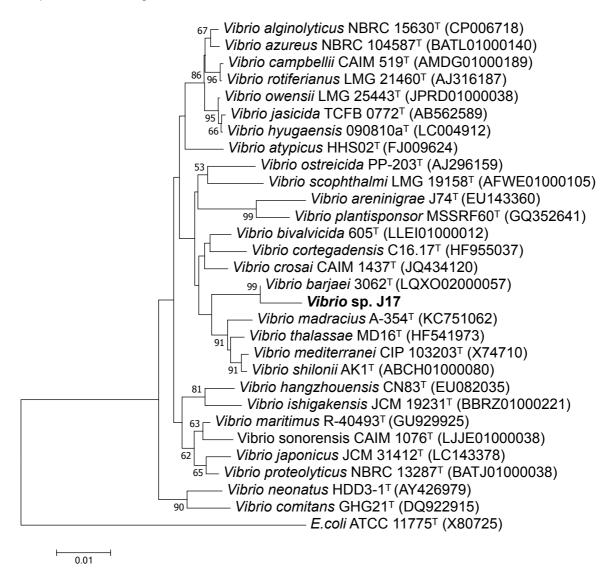
O gênero Ruegeria foi proposto quando da reclassificação da bactéria Agrobacterium atlanticum como a espécie Ruegeria atlantica (UCHINO et al. 1998). Este gênero pertence à classe das Alphaproteobacterias, com apenas 18 espécies formalmente descritas (https://www.bacterio.net/genus/ruegeria acessada no 03-02-2022; WIRTH e WHITMAN, 2018). Com exceção da espécie R. lacuscaerulensis, isolada de um lago geotérmico, este gênero de bactérias é característico de ambientes marinhos. Existem algumas espécies isoladas de esponjas marinhas, como R. halocynthiae MOLA R1/13b a qual foi isolada da esponja do Mediterrâneo Crambe crambe (DOBERVA et al. 2014) e Ruegeria sp. KLH11 (com 99% de similaridade na sequência do gene 16S rRNA com R. lacuscaerulensis) isolada da esponja Mycale laxissima (ZAN et al. 2011). O metabolismo secundário do gênero Ruegeria ainda não foi amplamente investigado como o de outros gêneros de bactérias Gram-negativas. Já foram isolados de Ruegeria spp. moléculas sinalizadoras de Quorum Sensing (MOHAMED et al. 2008; SONNENSCHEIN et al. 2017), peptídeos cíclicos (MITOVA, POPOV e DE ROSA,2004), peptídeos não ribossomais (CHRISTIE-OLEZA e ARMENGAUD, 2010) e pequenos RNAs não codificantes (RIVERS et al. 2016).





A linhagem J17 apresentou 99% de similaridade com a espécie *Vibrio barjaei*, de acordo com a sequência de 600 pb do gene 16S. No entanto, para a filogenia do gênero *Vibrio*, o sequenciamento e análise do gene 16S não oferece uma resolução muito boa para espécies classificação taxonômica, sendo necessário o sequenciamento do gene *pyrH* para definir melhor a espécie. Na figura 5.5 apresenta-se a árvore filogenética das espécies de *Vibrio* para a linhagem J17.

Figura 5.5 — Árvore filogenética de junção de vizinhos das espécies de *Vibrio* baseada no sequenciamento do gene 16S rRNA.



O gênero *Vibrio* pertence à classe das Gammaproteobacterias, do qual existem atualmente 136 espécies descritas (<a href="https://www.bacterio.net/genus/vibrio">https://www.bacterio.net/genus/vibrio</a> acessada no 03-02-2022). *Vibrio* spp. são muito abundantes em ambientes marinhos e encontram-se como micro-organismos de vida livre, bem como associados à superfície de corais, lulas, camarões, peixes, moluscos e esponjas, ou nos órgãos internos de alguns invertebrados e peixes marinhos (THOMPSON, LIDA e SWINGS, 2004). Apesar da abundância relativamente alta em ambientes marinhos, bactérias do gênero *Vibrio* ainda foram pouco exploradas na produção de metabólitos

secundários. Compostos isolados deste gênero apresentam um amplo espectro de atividades biológicas, como antibiótica (MASSCHELEIN, JENNER e CHALLIS, 2017), anticâncer e antiviral (MANSSON, GRAM e LARSEN, 2011).

Em comparação com as Actinobactérias Gram-positivas reconhecias como a fonte mais prolífica de compostos bioativos, as bactérias Gram-negativas têm sido estudadas em menor proporção no que se refere ao seu metabolismo secundário. Estas bactérias caracterizam-se por possuírem genomas pequenos (aproximadamente cerca de 6 Mb). Por isso até pouco tempo acreditava-se que não tinham as mesmas capacidades biossintéticas que as suas contrapartes Gram-positivas. Porém, recentemente a investigação do metabolismo secundário de bactérias Gram-negativas ganhou importância, demonstrando potencial terapêutico e mecanismos biossintéticos sem precedentes (MASSCHELEIN, JENNER e CHALLIS, 2017). Abordagens genéticas, do tipo "bottom-up", têm sido utilizadas para investigar o potencial destas bactérias para a produção de peptídeos não ribossomais (NRP), policetídeos (PK) ou híbridos NRP-PK, os quais, pelas abordagens clássicas podem não ser descobertos, uma vez que as condições de crescimento e produção de bactérias Gram-negativas ainda não são tão bem conhecidas como das bactérias Gram-positivas (MACHADO et al. 2015).

#### 5.5 Estudo químico da linhagem Vibrio sp. J17

Experimentos de crescimento em escala de 60 L da linhagem *Vibrio* sp. J17 foram realizados com o intuito de se isolar os compostos responsáveis pelos picos cromatográficos observados por UPLC-HRMS no *screening* inicial. O meio de cultivo da bactéria *Vibrio* sp. J17 foi adsorvido com uma resinas XAD-2, -4 e -7HP. Depois de dessorbidas com MeOH e acetona, esta fração orgânica foi desengordurada por partição entre MeOH/H<sub>2</sub>O 9:1 e hexano. A fração polar foi submetida a diversas etapas de fracionamento (cromatografia em coluna em fase reversa C18, Sephadex® LH-20) e sucessivas etapas de purificação (HPLC em fase reversa), levando ao isolamento de dois compostos ainda impuros J17-C1 (0,3 mg) e J17-C2 (0,2 mg). Devido ao baixo rendimento de massa dos compostos isolados insuficiente para sua elucidação estrutural, e à falta de outras frações de interesse desta bactéria, o estudo químico do meio de crescimento desta linhagem não foi continuado.

#### 5.6 Estudo químico da linhagem Ruegeria sp. J49

Um primeiro crescimento em escala de 20 L da linhagem *Ruegeria* sp. J49 foi realizado, objetivando-se o isolamento dos compostos de interesse a partir do meio de crescimento, identificados no *screening* inicial por UPLC-HRMS. Porém não foram obtidas quantidades suficientes destes compostos. Por isso, foi realizado um segundo crescimento desta linhagem em mais 40 L de meio de cultivo, seguindo o mesmo procedimento de fracionamento e purificação previamente descritos. Apesar dos compostos alvos terem sido observados em algumas frações nas análises por UPLC-HRMS, não foi possível isolá-los em quantidades suficientes devido à complexidade das frações e a presença predominante de componentes do meio de cultivo. Por este motivo o trabalho com o extrato bruto do meio de cultivo desta linhagem não foi continuado.

Os experimentos realizados com as duas linhagens Vibrio sp. J17 e Ruegeria sp. J49 não forneceram os resultados esperados. Em ambos casos, apesar dos esforços para se remover o meio de cultivo, observou-se que as frações de interesse apresentavam grande quantidade de componentes do meio de crescimento. Embora a metodologia usando a mistura das resinas adsorptivas XAD-2, XAD-4 e XAD-7HP tivesse sido apresentado bons resultados no laboratório do Professor Berlinck (NICACIO et al. 2017; RODRIGUEZ et al. 2020), os resultados desfavoráveis obtidos demostraram que, neste caso em particular, a metodologia empregada para a captura dos metabólitos secundários não foi a mais eficiente. Mais recentemente, estudos comparativos realizados por outra aluna de doutorado do grupo (Lamonielli F. Michaliski) demonstraram que o uso da resina HP-20 para extração de metabólitos a partir do meio de cultivo de bactérias é mais eficaz do que o uso de resinas do tipo XAD (Michaliski et al., resultados ainda não publicados). Todavia, infelizmente estes resultados foram obtidos depois dos estudos por nós realizados, e não testamos a extração dos meios de cultivo das bactérias isoladas da esponja T. brasiliensis com resina HP-20.

# 5.7 Sequenciamento e análise dos genomas das bactérias *Vibrio* sp. J17 e *Ruegeria* sp. J49

#### 5.7.1 Genoma da linhagem Vibrio sp. J17

O genoma total da linhagem J17 *Vibrio* sp. foi sequenciado utilizando a tecnologia Illumina (APPOLINARIO et al. 2016) e montado em 36 contigs, com um tamanho de 5.509.014 pb e com conteúdo total de GC de 45,4%. A análise dos contigs por antiSMASH 4.0 (BLIN et al. 2017), em busca de grades abertas de leitura (*Open Reading Frames*, ORF) codificantes para a biossíntese de metabólitos secundários, identificou 5 *gene clusters*, 2 codificantes para bacteriocinas, 1 para sideróforo, 1 para acil-homoserinlactonas e 1 para um arilpolieno (Tabela 5.2).

Tabela 5.2 — *Gene clusters* identificados no genoma da bactéria J17 *Vibrio* sp. pelo software online antiSMASH 4.0.

Cluster	Tipo	Tamanho (kb)	Cluster mais parecido (% similaridade)
1	Bacteriocina	10,9	Desconhecido
2	Sideróforo	14,4	Aerobactina (66%)
3	Homoserinlactona	20,6	Desconhecido
4	Arilpolieno	32,3	APE Vf (85%)
5	Bacteriocina	10,9	Desconhecido

Fonte: autoria própria.

#### 5.7.2 Genoma de linhagem Ruegeria sp. J49

O genoma total da linhagem J49 *Ruegeria* sp. foi sequenciado por tecnologia Illumina e montado em 35 contigs com um tamanho de 4.659.738 pb e um conteúdo total de GC de 57.3%. A análise por antiSMASH 4.0 identificou 10 gene clusters relacionados ao metabolismo secundário desta bactéria: 1 para bacteriocina, 4 para acil-homoserinlactonas, 1 para lantipeptídeo, 1 para arilpolieno, 1 para betalactona, 1 para ectoina e 1 para terpeno (Tabela 5.3).

Tabela 5.3 — *Gene clusters* identificados no genoma da bactéria J49 *Ruegeria* sp. pelo software online antiSMASH 4.0.

Cluster	Tipo	Tamanho (kb)	Cluster mais parecido (% similaridade)
1	Bacteriocina	10,9	Desconhecido
2	Homoserinlactona	20,2	Desconhecido
3	Homoserinlactona	20,7	Desconhecido
4	LAP	25,3	Desconhecido
5	Homoserinlactona	20,7	Desconhecido
6	Arilpolieno	43,6	APE Vf (30%)
7	Betalactona	26,8	Desconhecido
8	Homoserinlactona	20,6	Desconhecido
9	Ectoina	10,4	Desconhecido
10	Terpeno	20,8	Desconhecido

O insucesso no isolamento de metabólitos secundários a partir dos meios de cultivo destas duas linhagens pode estar diretamente relacionada com os resultados do sequenciamento dos seus genomas. Acredita-se que o potencial para a produção de metabólitos secundários está relacionado ao tamanho do genoma das bactérias, uma vez que o número de genes presentes apresenta correlação linear com sua extensão (MACHADO et al. 2015). Porém, a porcentagem do genoma dedicada ao metabolismo secundário é o que realmente determina o potencial de uma linhagem para produzir compostos bioativos. Um exemplo é o caso de bactérias marinhas do gênero *Salinispora* sp., as quais apresentam genoma de tamanho médio de aproximadamente 5 Mb, 10% do qual relacionado à biossíntese de metabólitos secundários (UDWARY et al. 2007; ZIEMERT et al. 2014). No caso das bactérias *Vibrio* sp. J17 e *Ruegeria* sp. J49, estas bactérias apresentam respectivamente 1,6% e 4,7% dos seus genomas à biossíntese de metabólitos secundários, nenhum destes pertencentes a alguma classe de compostos usualmente interessantes do ponto de vista químico, biossintético ou biológico, como peptídeos não-ribossomais

(NRP) ou policetídeos (PK). Estes resultados demostram que, embora tenham sido identificados *gene clusters* nos genomas nas duas bactérias, o potencial biossintético é limitado, muito provavelmente o motivo pelo qual as tentativas de isolamento de compostos a partir delas não foram bem sucedidas.

Um outro fator a ser considerado é que muitas bacterias isoladas de macroorganismos marinhos (como esponjas, corais e ascidias, por exemplo) são de difícil cultivo em condições de laboratório, se estimando que ao redor do 95% são consideradas não cultiváveis (EPSTEIN 2013), devido à impossibilidade de replicar as condições naturais do hospedeiro e/ou do entorno que promovem o crescimento (DAT et al. 2021). Para agravar este quadro, quando cultivadas em laboratório estas bacterias em geral apresentam baixo rendimento na produção de metabólitos secundários, sendo igualmente problemática a reprodução do crescimento para a produção destes metabólitos (WATERS et al. 2014; ZHU et al. 2015; IOCA, 2020). Por isso, a investigação do metabolismo secundário destas bacterias simbiontes, ou associadas, a macro-organismos marinhos ainda é um grande desafio (PIEL, 2006). Nesse sentido, avanços em novas estratégias de cultivo como o desenho de médios de cultivo, sistema que imitam as condições naturais, otimização de condições de cultivo em bio-reatores, estão resolvendo, de alguma maneira, esses problemas (ROMANO et al. 2016; MaCuMBA Group. MaCuMBA Project Legacy Brochure https://www.macumbaproject.eu/images/MACUMBA/Media/Public\_Deliverables/ Legacy Brochure FINAL HR.pdf acessada no 05-06-2022).

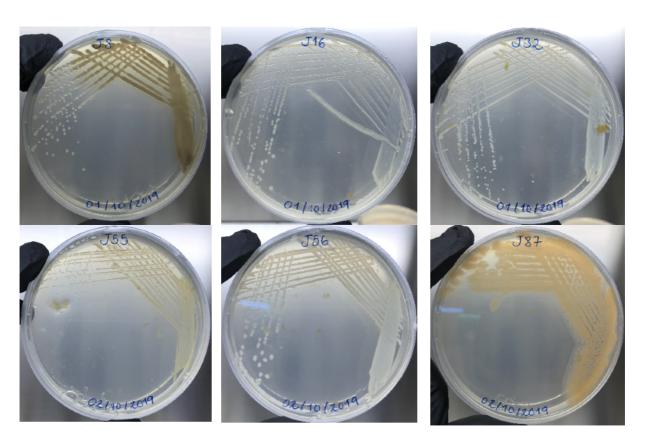
## 5.8 Estudo metabolômico de bactérias cultiváveis associadas à esponja marinha *T. brasiliensis*

#### 5.8.1 Seleção das linhagens

Objetivando-se uma visão mais ampla das capacidades metabólicas das bactérias isoladas da esponja *T. brasiliensis*, decidiu-se empregar a metodologia OSMAC em um grupo selecionado de linhagens de bactérias. Empregou-se cinco diferentes condições de cultivo, bem como o uso de um suporte sólido de bolas de algodão que pudesse eventualmente se assemelhar o ambiente natural dessas bactérias e favorecer sua expressão metabólica (TIMMERMANS et al. 2019). Por

outro lado, objetivando-se realizar uma análise mais precisa, cuidadosa e confiável dos perfis químicos das bactérias, utilizou-se uma abordagem de análise metabolômica dos extratos por UPLC-HRMS. Foram selecionadas 6 linhagens que cresceram segundo as 5 condições testadas e que apresentaram claras diferenças morfológicas entre as linhagens, evitando-se trabalhar com bactérias muito semelhantes. As linhagens bacterianas foram reativadas a partir dos criotubos de preservação em placas de MA e crescidas durante 2 dias à 28 °C. Posteriormente, colônias individuais de cada bactéria foram estriadas em placas de Petri contendo ágar dos meios A1-modificado, AM3, ASW-A e YEME e crescidas por 2 dias à 28 °C, de maneira a se observar a viabilidade das bactérias e seu crescimento nestes meios de cultivo. As linhagens de bacterias selecionadas foram as de código J8, J16, J32, J55, J56 e J87 (Figura 5.6).

Figura 5.6 — Fotografias das linhagens de bacterias isoladas a partir da esponja *T. brasiliensis* selecionadas para realização de estudo metabolômico.



Fonte: autoria própria.

#### 5.8.2 Crescimento e extração em pequena escala das linhagens selecionadas

Com o objetivo de favorecer a produção de metabólitos secundários, cada uma das bactérias foi crescida em 10 diferentes condições de cultivo (5 meios diferentes, cada um com e sem fragmentos de algodão). Decidiu-se avaliar a alternativa de colocar fragmentos de algodão nos meios de cultivo levando-se em conta os resultados obtidos por Timmermans et al. (2019). Estes autores demonstraram que a adição de fragmentos de algodão ao meio de crescimento de bactérias isoladas de esponjas aumentou a produção de metabólitos secundários conhecidos, como as bromoalterocromidas, o tiomarinol A e a violaceina, junto com a produção de outros potencialmente inéditos (Figura 5.7).

Figura 5.7 — Estruturas dos compostos identificados de bactérias isoladas de esponjas marinhas crescidas com adição de fragmentos de algodão no meio de cultivo.

Fonte: autoria própria.

Os perfis químicos de cada experimento de crescimento das 6 linhagens foram avaliados por UPLC-HRMS. Foi utilizada a plataforma XCMS Online para

análises metabolômicas comparativas mediante análises pareadas (*pairwise analysis*). Nestas análises os cromatogramas de íons totais (TIC) das replicatas técnicas de uma amostra são alinhados e comparados com os de outra amostra. Assim, é possível determinar as *features* (íons identificados pela relação *m/z* e tempo de retenção  $r_t$ ) que possuem uma diferença estatisticamente significativa na intensidade em um extrato versus o outro e mostrá-las como círculos em gráficos de nuvens (*cloud plots*). Quanto maior o círculo, maior a diferença na intensidade do sinal, e quanto mais escura a cor, mais significativo o sinal em termos estatísticos de detecção.

As análises na plataforma XCMS Online foram realizadas mediante análise pareadas dos extratos de cada uma das bactérias em cada condição de crescimento com o respectivo controle negativo. Desta forma, buscou-se identificar em qual(is) condição(ões) a bactéria aumenta a produção de metabólitos secundários, bem como distingui-los de componentes de meio de cultivo e evitar os inconvenientes apresentados na parte inicial do projeto. Dentre as seis linhagens analisadas por métodos de metabolômica, a linhagem J55 foi a que apresentou os resultados mais significativos. Para as outras linhagens não foram observados resultados que permitissem observar a produção de compostos em alguma das condições avaliadas.

A linhagem J55 caracterizou-se por apresentar morfologia diferenciada quando comparado com o crescimento em meio MA. Na figura 5.8 pode-se observar o maior tamanho e cor mais intensa das colônias desta bactéria nos meios A1, AM3, ASW-A e YEME, indicando dependência do fenótipo expresso pela bactéria nestes meios. Inicialmente, foram observadas diferenças notáveis entre os meios de cultivo usados, bem como no uso das resinas XAD ou do algodão no meio de cultivo. Como pode-se observar na figura 5.9a, quando a bactéria foi crescida com a mistura das resinas XAD, o extrato apresentou uma coloração vermelha nos meios AM3, ASW-A e YEME. Esta coloração não foi observada nos meios A1 e MB, indicando claramente uma produção diferenciada de compostos por parte desta linhagem nos meios de cultivo avaliados. Já nos experimentos realizados com as bolas de algodão no meio de cultivo não se observou nenhuma diferença perceptível, nem nas análises metabolômicas destes.

Figura 5.8— Fotografias do crescimento da linhagem J55 em placas dos meios sólidos a) MA, b) A1, c) AM3, d) ASW-A e e) YEME. Observa-se a clara mudança no tamanho e cor das colônias nos diferentes meios.

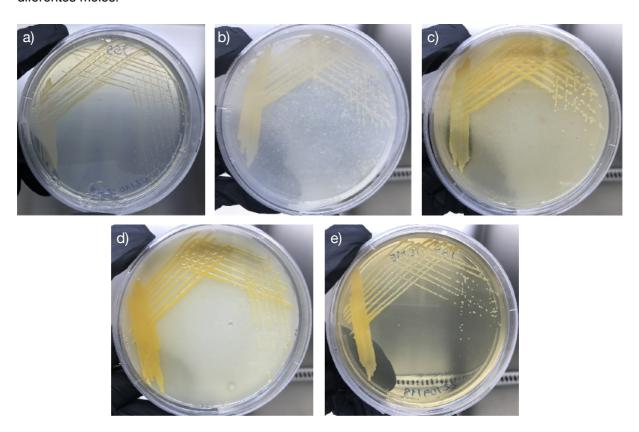
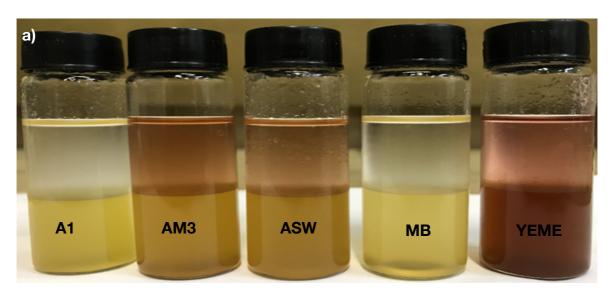
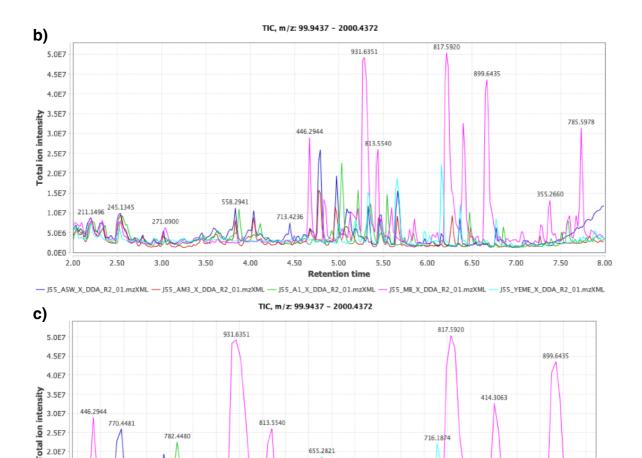


Figura 5.9— a) Partição com acetato de etila dos extratos dos meios de cultivo da bactéria J55 crescidos na presença da mistura das resinas XAD nos meios utilizados. b) Cromatogramas de íons totais (TICs) obtidos das frações de acetato de etila dos extratos XAD da bactéria J55. c) Ampliação na qual pode se-observar algumas das diferenças obtidas nos perfis químicos.





— J55\_ASW\_X\_DDA\_R2\_01.mzXML — J55\_AM3\_X\_DDA\_R2\_01.mzXML — J55\_A1\_X\_DDA\_R2\_01.mzXML — J55\_MB\_X\_DDA\_R2\_01.mzXML — J55\_YEME\_X\_DDA\_R2\_01.mzXML

5.60 5.70 5.80

Retention time

5.50

5.30 5.40

426 3022

6.10 6.20 6.30

355.2657

414.3025

Fonte: autoria própria.

4.80 4.90

5.00 5.10 5.20

1.5E7

1.0E7

5.0E6

A classificação taxonômica da linhagem bacteriana J55 por sequenciamento do gene 16S rRNA, mostrou que tem similaridade >99,7% com a espécie *Microbacterium testaceum* DSM 20166. *Microbacterium* é um gênero de actinobacterias Gram-positivas com 145 espécies descritas até hoje (<a href="https://lpsn.dsmz.de/search?word=microbacterium">https://lpsn.dsmz.de/search?word=microbacterium</a> acessada no 16-06-2022) o qual foi estabelecido depois da unificação dos gêneros *Microbacterium* e *Aureobacterium* (TAKEUCHI e HATANO 1998). São descritos como micro-organismos endofíticos ou associados à rizosfera de plantas (RASHID, CHARLES e GLICK, 2012; ALVES et al. 2014), bem como encontrados em ambientes marinhos como sedimentos (SHIVAJI

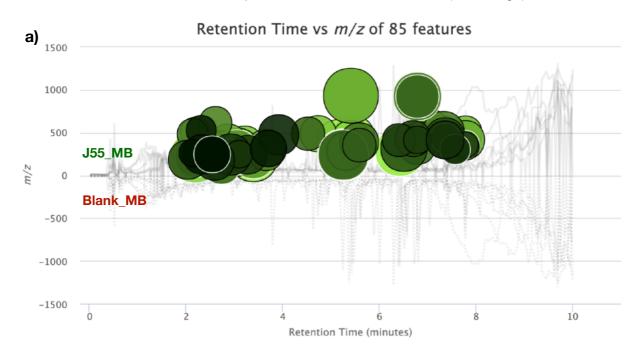
et al. 2007), associados a ostras (CHAUHAN et al. 2013), e a esponjas (WICKE et al. 2000; TABARES et al. 2011; KARIMI et al. 2017).

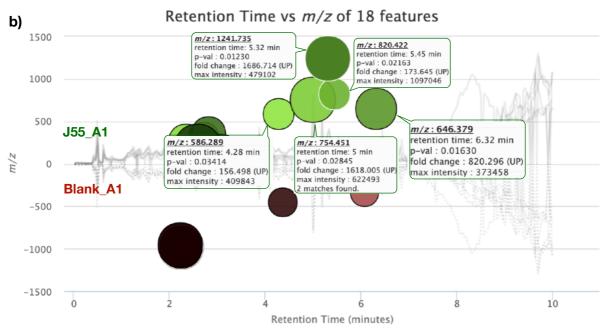
Os dados de UPLC-HRMS (Figura 5.10b e 5.10c) indicaram claras diferenças entre os perfis metabólicos da bactéria nos 5 meios com a misturas das resinas XAD.

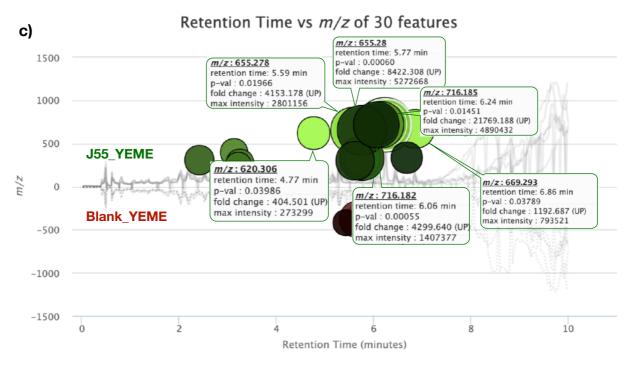
Análises comparativas dos perfis metabólicos de cada meio de cultivo com o seu respectivo controle negativo foram realizadas aplicando filtros rigorosos tanto na intensidade do sinal (fold change > 100) quanto no valor de p (<0.05). Isso com o objetivo de que as *features* identificadas nos TICs dos extratos correspondam a compostos produzidos pela bactéria e que pudessem ser eventualmente priorizados para facilitar o isolamento por estarem possivelmente em grande proporção. Os resultados dessas comparações pareadas são indicados na figura 5.10.

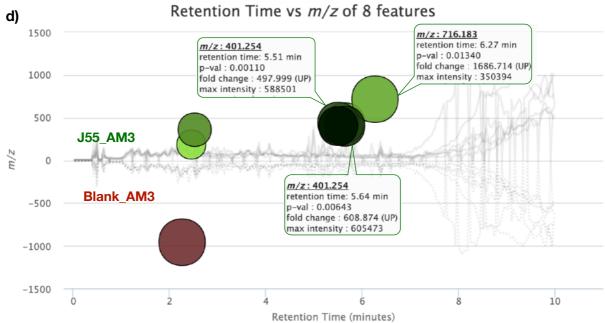
A figura 5.9a, mostra a análise *pairwise* dos TICs do extrato do meio MB (*up*) e do controle negativo do meio MB (*down*). Observa-se inicialmente que as 85 *features* detectadas na análise do meio MB foram todas encontradas no extrato da bactéria, porém a inspeção manual nos dados brutos para verificar a validade das *features* identificadas mostrou que estas correspondiam a componentes do meio de cultivo. Este resultado está de acordo com a triagem inicial desta linhagem no meio MB, no qual a bactéria não produziu metabólitos secundários e que indicam quão complexa é a matriz deste meio.

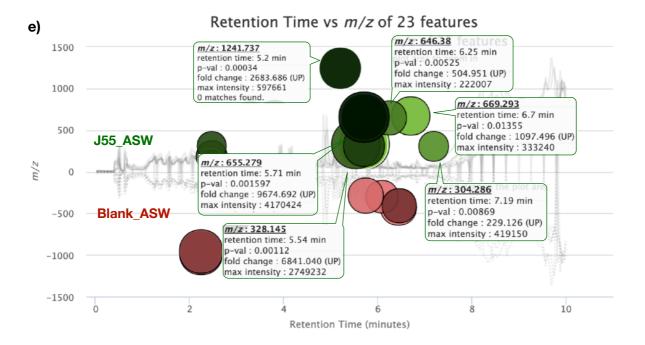
Figura 5.10 — *Cloud plots* que comparam os perfis metabolômicos da linhagem *Microbacterium testaceum* J55 com os brancos dos meios de cultivo: a) MB, b) A1-modificado, c) YEME, d) AM3, e e) ASW-A. Os resultados foram filtrados para *features* com um incremento (*fold change*) maior a 100.









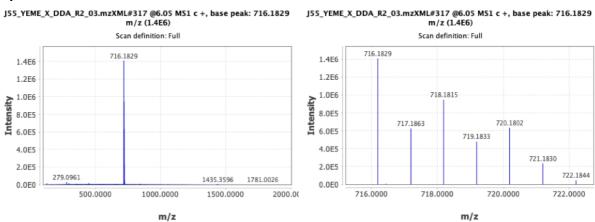


Nas análises pareadas dos perfis metabólicos dos outros meios com os respectivos controles negativos comprovou-se que a bacteria M. testaceum J55 produziu metabólitos diferenciados. No caso do meio A1, das 18 features detectadas destacaram-se as 5 indicadas na figura 5.10b, pois não foram encontradas no controle negativo do meio A1. A análise comparativa do perfil no meio YEME (Figura 5.10c) indicou um maior número de features detectadas, 30 em total, das quais aquelas que se destacaram nenhuma apareceu no meio A1, evidenciando perfis completamente diferentes entre estes meios. Neste caso, chamou a atenção a observação de um grupo de features entre 6,06 - 6,24 min que mostravam um aumento no sinal entre 4000-21000 vezes dos íons com m/z entre 716,18 — 720,18. A verificação manual dos dados brutos indicou tratar-se de dois picos com m/z 716,18 em 6,06 min e 6,24 min, os quais possuem um padrão de distribuição isotópica típica para 3 cloros, devido à presença dos íons M+2, M+4 e M+6 (Figuras 5.11a e 5.11b). Adicionalmente, encontrou-se um pico de m/z 730,18 em 6,98 min, que não foi detectado na análise no XCMS Online, que também contém 3 átomos de cloro (Figura 5.11c). A obtenção dos cromatogramas de íon extraído (XICs) para estas massas tanto no extrato da bactéria quanto no controle negativo permite

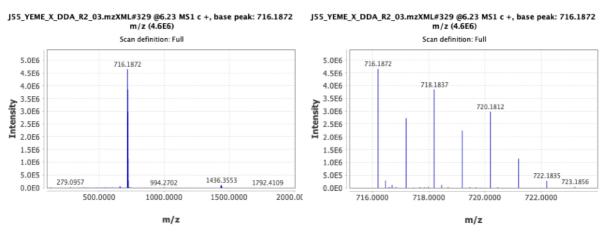
confirmar que se tratam de compostos produzidos pela bactéria *Microbacterium testaceum* J55 (Figura 5.11d).

Figura 5.11 — Espectros de massas dos íons a) m/z 716,18 em 6,05 min, b) m/z 716,18 em 6,23 min e c) m/z 730,19 em 6,98 min. Pode-se observar claramente nas ampliações dos espectros, o padrão de distribuição isotópica característico para 3 átomos de cloro. d) cromatogramas de íon extraído (XIC) das m/z 716,18 e 730,19 tanto no extrato quanto no controle negativo, que mostra que estes picos estão presentes somente no extrato da bactéria.

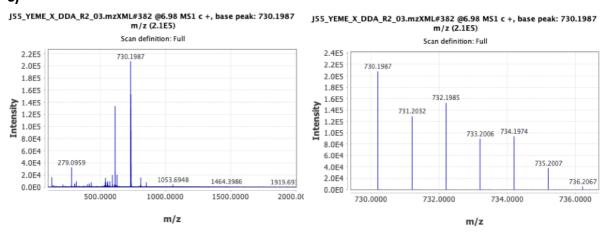


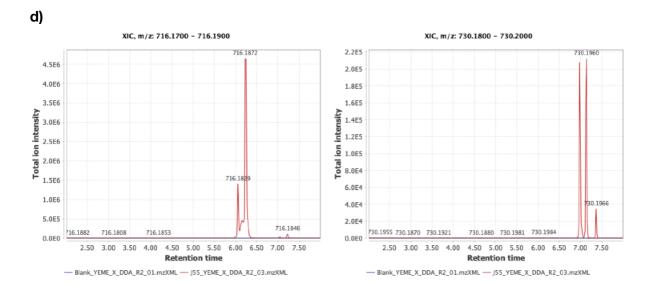


b)



c)





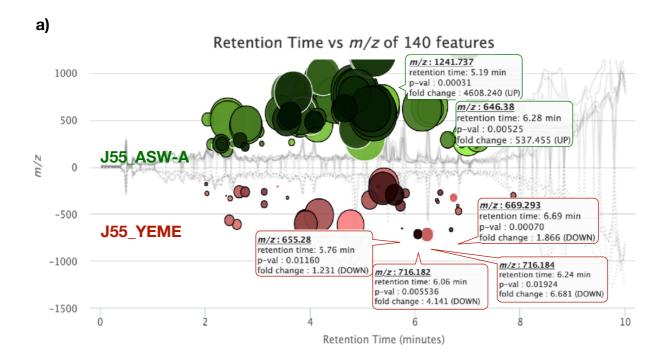
As análises pareadas dos meios AM3 e ASW-A, indicaram *features* observadas em outros meios. Por exemplo, no meio AM3 detectou-se o íon m/z 716,18, além de dois íons com m/z 401,25 em 5,51 min e 5,64 min (Figura 5.10d). No meio ASW-A, os íons m/z 716,18 não foram detectados, mas os íons m/z 655,28 foram, bem como o íon m/z 1241,74 (Figura 5.10e) o qual havia-se identificado no meio A1.

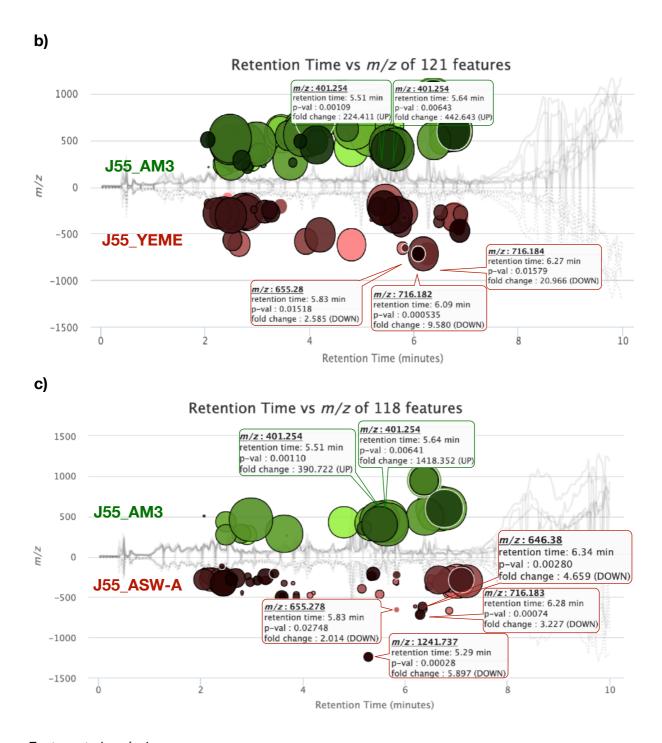
Considerando-se estes resultados que indicam que a bactéria *M. testaceum* J55 foi capaz de expressar suas capacidades metabólicas em meios de crescimento distintos de maneira diferenciada, decidiu-se determinar em qual dos meios testados se favorece a produção dos compostos, fazendo a análise pareada dos extratos da bactéria para estabelecer a variação estatisticamente significativa entre os extratos.

A comparação dos perfis metabólicos dos meios ASW-A (up) e YEME (down) é apresentada na figura 5.12a. Observou-se que os compostos que apresentaram os íons m/z 716,18 em 6,06 e 6,24 min tiveram incremento de produção considerável (aproximadamente 4 e 7 vezes a mais) no meio YEME. No caso dos compostos que apresentaram os íons m/z 655,28 e 669,29, o incremento da produção foi também observado no meio YEME, de aproximadamente 1 e 3 vezes a mais para cada um. No caso dos compostos que apresentaram os íons m/z 1241,74 e 646,38, os

incrementos de produção no meio ASW-A foram significativamente superiores, de aproximadamente de 4500 e 500 vezes, respectivamente. Quando comparados os perfis metabólicos da bactéria J55 nos meios AM3 e YEME (Figura 5.12b), observou-se que a produção dos compostos clorados de *m/z* 716,18 e dos compostos de *m/z* 655,28 é mais significativa no meio YEME, e que os compostos com *m/z* 401,25 são produzidos somente no meio AM3. A comparação da expressão metabólica da bactéria *M. testaceum* J55 crescida nos meios AM3 e ASW-A (Figura 5.12c) apresenta ligeiro aumento na produção dos compostos com *m/z* 716,18 e 655,28 no meio ASW-A, além dos compostos com *m/z* 1241,74 e 646,38. No gráfico de nuvens pode-se observar que os dois compostos com *m/z* 401,25 são produzidos somente no meio AM3, como anteriormente mencionado.

Figura 5.12 — Gráfico de nuvens das análises pareadas dos perfis metabólicos da bactéria *M. testaceum* J55 nos meios a) ASW-A (*up*) vs YEME (*down*), b) AM3 (*up*) vs YEME (*down*) e c) AM3 (*up*) vs ASW-A (*down*).

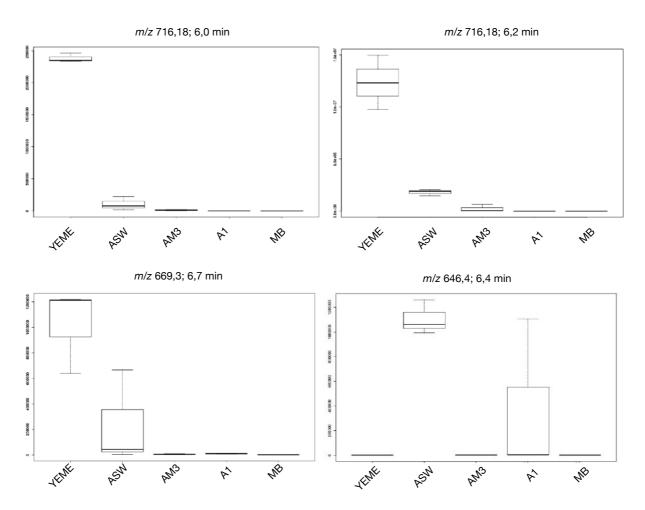




Embora tenhamos verificado significativas diferenças nos perfis metabólicos da bacteria *M. testaceum* J55 crescida em diferentes meios, verificou-se a produção dos compostos comuns nos diferentes meios para avaliar a abundância relativa destes por meio de uma análise multigrupo no XCMS Online (Figura 5.13). Observou-se que a maior produção dos compostos clorados de *m/z* 716,18 ocorreu

no meio YEME, bem como dos compostos com *m/z* 655,28 e 669,29. Observou-se também que os compostos com *m/z* 646,38 e 1241,74, foram produzidos pela bactéria J55 somente no meio ASW-A. A bactéria produziu a maior diversidade de compostos nos meios YEME e ASW-A. Não foi observada a produção de nenhum destes compostos no meio MB, como observado na triagem inicial, o que valida o fato de este meio não ser o mais apropriado para a bactéria.

Figura 5.13 — Gráficos de *box-and-whisker* gerados pelo XCMS Online da análise multigrupo que mostram a abundância relativa das *features* mais destacadas nos 5 meios de crescimento testados para a bacteria *M. testaceum* J55.



Fonte: autoria própria.

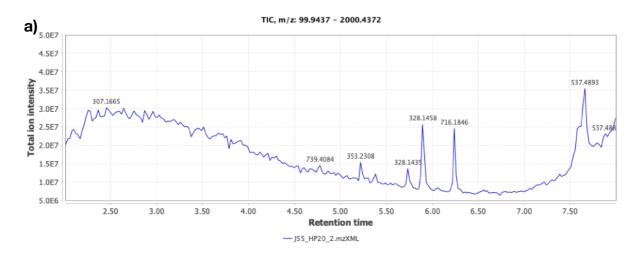
Nossa abordagem demonstrou que o cultivo da linhagem selecionada, em diferentes meios de cultivo é uma alternativa simples, mas eficiente, para se avaliar a expressão do metabolismo secundário da bacteria *M. testaceum* J55.

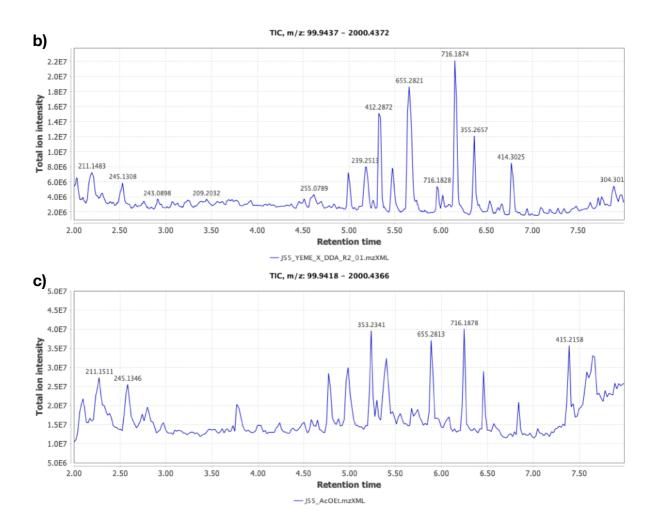
Complementada por análises metabolômicas comparativas não direcionadas, a estratégia adotada permite encontrar as condições mais favoráveis para a produção de metabólitos secundários potencialmente inéditos.

### 5.8.3 Estudo químico da linhagem J55

Levando-se em conta os resultados de metabolômica comparativa não-direcionada da linhagem *M. testaceum* J55, escolheu-se o meio YEME para realizar o crescimento em maior escala desta bactéria. Seguindo a metodologia descrita no ítem 4.10.6.1, foi utilizada resina adsortiva Diaion® HP-20, bem como a extração do meio de cultivo com AcOEt. Os perfis dos extratos da resina HP-20 e AcOEt foram avaliados por UPLC-HRMS. Verificou-se que o emprego da resina Diaion® HP-20 (Figura 5.14a) forneceu extrato mais limpo de meio de cultivo quando comparado com o extrato obtido com a mistura das resinas XAD (Figura 5.14b). Adicionalmente, o extrato do AcOEt (Figura 5.14c) do meio de cultivo apresentou um perfil químico similar ao da resina HP-20.

Figura 5.14 — Análises UPLC-HRMS dos extratos da bactéria J55. a) Extrato da resina HP-20. b) Extrato da mistura das resinas XAD-2, -4 e -7. c) Extrato de AcOEt do meio de cultivo.





O extrato bruto da bactéria crescida no meio YEME, chamado de J55\_X, foi fracionado por cromatografia em coluna em fase reversa C18, se obtendo as frações J55\_X1 a J55\_X5. Os extratos brutos dos cinco meios de cultivo utilizados para o estudo metabolômico da linhagem *M. testaceum* J55, bem como as frações J55\_X1 a J55\_X5, foram avaliados em bioensaios de atividade antibacteriana, antiplasmodial, anti-Leishmania e citotóxico sobre célula tumoral MCF-7 (câncer de mama). Os resultados indicaram a fração J55\_X5 como a mais a ativa nos bioensaios, com exceção do bioensaio de atividade antibacteriana no qual nenhuma amostra foi ativa. A maior atividade foi observada contra *Plasmodium falciparum* com porcentagens de inibição de 99%. Já a atividade inibitória sobre parasitas de *Leishmania* foi moderada, com valores de viabilidade celular entre

30-66%. A atividade contra as linhagens celulares de câncer de mama foi moderada (Tabela 5.4).

Tabela 5.4 — Atividade biológica dos extratos e as frações obtidos a partir do meio de crescimento da linhagem *M. testaceum* J55 nos bioensaios de ação anti-plasmodial, antileishmania e de citotoxicidade contra célula de câncer de mama (MCF-7).

		Antileishmania <sup>b</sup>				Citotoxicidade c	
Código	Antimalária <sup>a</sup>	50 μg/n	nfantum nL 100 μg/ mL	50 μg/mL	ziliensis . 100 µg/ nL	MCF-7	MCF-10A
J55_A1	74 ± 2	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
J55_AM3	26 ± 2	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
J55_ASW	26 ± 6	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
J55_X	11 ± 3	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
J55_X1	10 ± 2	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
J55_X2	18 ± 5	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
J55_X3	$84 \pm 0,2$	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
J55_X4	$99,9 \pm 0,2$	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
J55_X5	99 ± 1	100	44,6	65,7	29,6	32,9 ± 2,2	55,4 ± 2,8

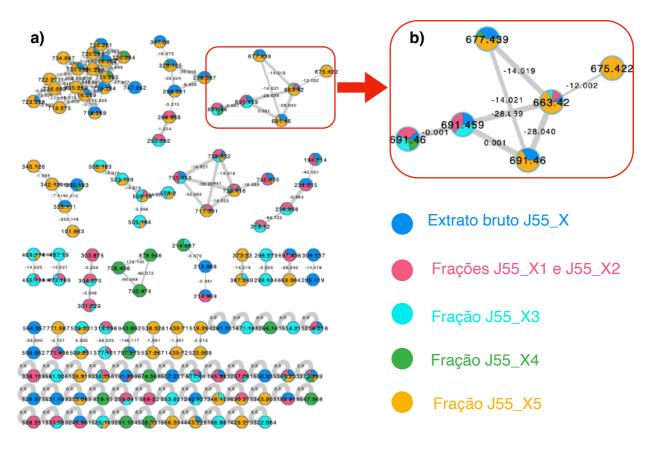
Legenda: <sup>a</sup> Atividade antiplasmodial contra a cepa *Plasmodium falciparum* 3D7 (sensível a cloroquina). Valores reportados como porcentagem de inibição à concentração de 50 μg/mL. <sup>b</sup> Ensaios *in vitro* com promastigotas de *Leishmania infantum* e *Leishmania braziliensis*, reportados como porcentagem de viabilidade celular nas duas concentrações indicadas. <sup>c</sup> Atividade contra linhagens celulares de câncer de mama (MCF-7) e células normais de mama (MCF-10A), expressas como valores de IC<sub>50</sub> em μg/mL.

Fonte: Autoria própria.

A análise de redes moleculares do extrato J55\_X e de suas respectivas frações permitiu identificar um cluster de massas presente majoritariamente na fração bioativa J55\_X5 (Figura 5.15). A verificação manual dos dados de HRMS e HPLC-MS confirmou a presença de compostos com estas massas na fração de interesse, direcionando o isolamento destes compostos. A variação de massa de 14

e 28 Da observada entre os nodos de interesse indicou a presença de uma e duas metilas ou metilenos a mais, respectivamente, para os compostos detectados.

Figura 5.15 — Análises de redes moleculares clássicas para frações obtidas do meio de crescimento da linhagem *M. testaceum* J55. a) Rede molecular com os nodos presentes somente no extrato bruto e as frações. Os gráficos de pizza representam a distribuição dos compostos nas frações. b) *Cluster* de massas detectados na fração bioativa J55\_X5.

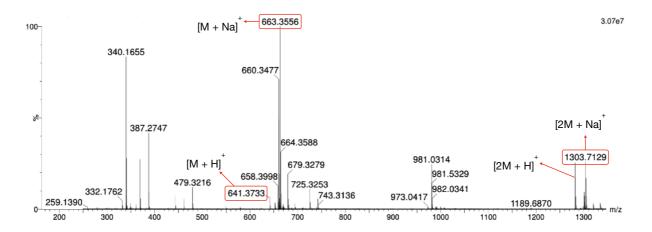


Fonte: autoria própria.

A purificação da fração J55\_X5 por cromatografia de exclusão por tamanho em coluna contendo a fase estacionária Sephadex® LH-20 e por HPLC em fase reversa utilizando coluna de C18, permitiu o isolamento dos glicoglicerolipídeos J55\_C8 a J55\_C11. Análises por RMN mono- e bi-dimensionais, e espectrometria de massas de alta resolução HRMS, indicaram uma série homóloga de compostos com idêntica parte glicosídica, mas diferenças na cadeia alifática do ácido graxo e na localização desta. Derivados peracetilados de cada composto foram obtidos por tratamento com anidrido acético em piridina por 12 h à temperatura ambiente, de maneira a se estabelecer a configuração relativa dos açúcares por análises de RMN.

Análise do composto J55\_C8 por espectrometria de massas de alta resolução apresentou os íons [M + H]<sup>+</sup> de *m/z* 641,3733 consistente com a fórmula molecular C<sub>30</sub>H<sub>57</sub>O<sub>14</sub> (calculada *m/z* 641,3748, erro -1,7 ppm), e [M + Na]<sup>+</sup> de *m/z* 663,3556 consistente com a fórmula molecular C<sub>30</sub>H<sub>56</sub>O<sub>14</sub>Na (calculada *m/z* 663,3568, erro -2,0 ppm), indicando 3 graus de insaturação (Figura 5.16).

Figura 5.16 — Espectro de massas alta resolução do composto J55\_C8 por ionização por *electrospray* em modo positivo (HRMS-ESI<sup>+</sup>).



Fonte: autoria própria.

A análise dos espectros monodimensionais de  $^1$ H,  $^{13}$ C-RMN e DEPT-135 do composto J55\_C8 (Figuras S1 a S3) indicou tratar-se de um glicolipídeo. A presença dos sinais típicos de grupos CH<sub>2</sub> alifáticos, no espectro de  $^1$ H um pico largo em  $\delta$  1,30 e no espectro de  $^{13}$ C um grupo entre  $\delta$  30,9—28,3, indicaram a presença de uma cadeia alifática saturada na estrutura. Por outro lado, duas unidades de açúcar foram observadas pelos sinais dos carbonos anoméricos em  $\delta$ C 102,4 e 102,2 além dos sinais característicos de oximetinos e oximetilenos entre  $\delta$ C 62,9-82,0 ( $\delta$ H 3,40-5,20). Adicionalmente, o sinal em  $\delta$ C 175,7 foi atribuído a uma carboxila, completando o índice de deficiência de hidrogênio calculado pela fórmula molecular.

Tomando-se como ponto de partida os hidrogênios anoméricos, a estrutura plana dos açúcares foi estabelecida como unidades de hexoses, considerando-se as análises dos espectros de COSY, HSQC e HMBC (Figura 5.17 e Tabela 5.5, Figuras S4 a S6). No caso do açúcar 1, foram identificados dois sistemas de spin, do H1' ( $\delta_{\rm H}$ 

5,13) até H5' ( $\delta_{\rm H}$  3,87) e o dos hidrogênios metilênicos H<sub>2</sub>6' ( $\delta_{\rm H}$  3,85/3,64), os quais foram unidos pelas correlações  $^2J_{\rm CH}$  H5'/C6', e  $^3J_{\rm CH}$  H<sub>2</sub>6'/C4' e H4'/C6'. No caso do açúcar 2, dois sistemas de spin do H1" ( $\delta_{\rm H}$  4,74) até H3" ( $\delta_{\rm H}$  3,84) e outro do H5" ( $\delta_{\rm H}$  3,78) até H<sub>2</sub>6" ( $\delta_{\rm H}$  4,40/4,23) foram identificados, os quais foram unidos pelas correlações  $^3J_{\rm CH}$  H4"/C6" e H<sub>2</sub>6"/C4", e  $^2J_{\rm CH}$  H4"/C5" e H5"/C4". Os deslocamentos químicos desblindados dos hidrogênios H5' ( $\delta_{\rm H}$  3,87) e H5" ( $\delta_{\rm H}$  3,78) e as correlações  $^3J_{\rm CH}$  H1'/C5', H5'/C1', e H1'/C5' indicaram que ambos açúcares existem na forma de piranoses.

Um sistema de spin constituído pelo oximetino H2" em  $\delta_H$  3,80 e os dois oximetilenos H<sub>2</sub>1" em  $\delta_H$  3,77/3,42 e H<sub>2</sub>3" em  $\delta_H$  3,58/3,53 foram atribuídos a uma unidade de glicerol, levando-se em conta correlações COSY e dos seus respectivos carbonos. Correlações intensas  ${}^3J_{CH}$  H1"/C1" e H<sub>2</sub>1"/C1" indicaram que a unidade de glicerol se encontrava ligada ao carbono anomérico do açúcar 2.

Com relação à porção ácido graxo da estrutura, o tripleto  $\delta_{\rm H}$  2,36 e o multipleto em  $\delta_{\rm H}$  1,63 apresentaram intensas correlações  $^2J_{\rm CH}$  e  $^3J_{\rm CH}$  com a carbonila em  $\delta_{\rm C}$  175,7, respectivamente, confirmando a presença de uma cadeia de ácido graxo. De acordo com o número de sinais no espectro de  $^{13}{\rm C}$  e ao restante de carbonos segundo a fórmula molecular calculada, foi evidenciada a presença de um ácido graxo de 15 átomos de carbono na estrutura do composto J55\_C8. O espectro de HSQC mostrou a presença de uma metila tripleto ( $\delta_{\rm H}$  0,88,  $\delta_{\rm C}$  11,9) e uma metila dupleto ( $\delta_{\rm H}$  0,86,  $\delta_{\rm C}$  19,8), típicas de uma cadeia ramificada *anteiso*, indicando que se trata do ácido 12-metil-tetradecanoico. Finalmente, a correlação  $^3J_{\rm CH}$  H<sub>2</sub>6"/C1 confirmou inequivocamente a ligação da cadeia alifática ao carbono 6".

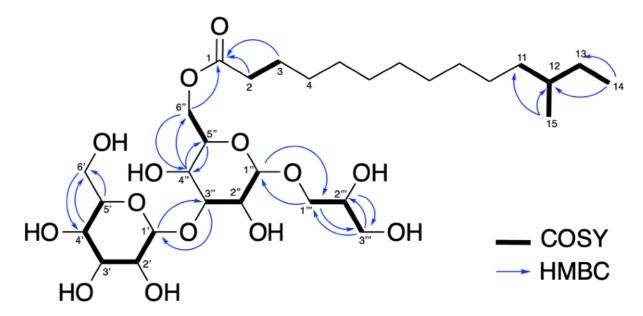
O sinal de C3" ( $\delta_{\rm C}$  81,7) indicou este carbono como o ponto da ligação glicosídica entre as duas unidades de açúcar, hipótese corroborada pela observação de correlações intensas  $^3J_{\rm CH}$  H3"/C1' e H1'/C3". Desta maneira se estabeleceu inequivocamente a ligação glicosídica 1'-3" entres os açúcares.

Tabela 5.5 — Dados de RMN do composto J55\_C8 (MeOH- $d_4$ ; <sup>1</sup>H em 600 MHz, <sup>13</sup>C em 150 MHz).

	Posição	$\delta_{\rm C}$ , mult.	$\delta_{H}$ ( $J$ em Hz)	COSY	НМВС
Aglicona	1	175,7 C	_	_	-
	2	35,1 CH <sub>2</sub>	2,36 (t, 7,4)	3	1, 3, 4
	3	26,2 CH <sub>2</sub>	1,63 (m)	2	1, 2, 4
	4-10	28,3-31,2 CH <sub>2</sub>	1,30	-	-
	11	37,9 CH <sub>2</sub>	a-1,30	-	-
			b-1,10	-	-
	12	35,8 CH	1,31	15	14, 15
	13	30,7 CH <sub>2</sub>	a-1,35	13	11, 12, 14, 15
			b-1,14	13	11, 12, 14, 15
	14	11,9 CH <sub>3</sub>	0,88 (t, 7,2)	13a, 13b	12
	15	19,8 CH <sub>3</sub>	0,86 (d, 6,4)	12	11, 12
Açúcar 1	1'	102,2 CH	5,13 (d, 3,8)	2'	2', 3', 5', 3"
	2'	74,2 CH	3,41 (dd, 3,8-9,7)	1', 3'	3'
	3'	75,3 CH	3,70 (t, 9,3)	2', 4'	1', 2', 4', 5'
	4'	72,1 CH	3,25 (t, 9,5)	3', 5'	2', 3', 5', 6'
	5'	74,2 CH	3,87 (m)	4'	1', 6'
	6'	62,9 CH <sub>2</sub>	a-3,85 (m)	6b'	4'
			b-3,64 (dd, 6,7-11,9)	6a'	4', 5'
Açúcar 2	1"	102,4 CH	4,74 (d, 1,6)	2"	2", 3", 5", 1"
	2"	71,2 CH	4,12 (tl)	1", 3"	1", 3", 4"
	3"	81,7 CH	3,84 (m)	2"	4", 1'
	4"	67,7 CH	3,86 (m)	-	3", 5", 6"
	5"	72,3 CH	3,78 (m)	6a", 6b"	3", 4"
	6"	65,0 CH <sub>2</sub>	a-4,40 (dd, 2,1-11,8)	5", 6b"	4", 5", 1
			b-4,23 (dd, 6,2-11,8)	5", 6a"	4", 5", 1
Glicerol	1"	70,3 CH <sub>2</sub>	a-3,77 (m)	1b"', 2"'	1", 2"', 3"

		b-3,42 (m)	1a"', 2"'	1", 2"', 3"
2"	72,3 CH	3,80 (m)	1a'", 1b'", 3a'", 3b'"	1"', 3"
3"	64,4 CH <sub>2</sub>	a-3,58 (dd, 5,2-11,1)	3b"', 2"'	1"', 2"'
		b-3,53 (dd, 5,6-11,1)	3a"', 2"'	1"', 2"'

Figura 5.17 — Estrutura plana do composto J55\_C8. Principais correlações de HMBC e COSY para J55\_C8.



Fonte: autoria própria.

A análise das constantes de acoplamento  ${}^3J_{\rm HH}$  permitiu determinar o tipo de hexopiranoses. No caso do açúcar 1, a constante  $J_{\rm H1'-H2'}$  3,8 Hz típica de um acoplamento equatorial-axial, indicou uma configuração anomérica a. As magnitudes das constantes de acoplamento  $J_{\rm H2'-H3'}$  9,7 Hz,  $J_{\rm H3'-H4'}$  9,3 Hz e  $J_{\rm H4'-H5'}$  9,5 Hz, característicos de uma orientação axial-axial, permitiram estabelecer o açúcar 1 como sendo a a-glicose. No caso do açúcar 2, a pequena constante de acoplamento  $J_{\rm H1''-H2''}$  1,6 Hz indicou um acoplamento equatorial-equatorial dos hidrogênios, estabelecendo uma configuração anomérica a. A sobreposição dos outros sinais

deste açúcar impediu a medida das constantes de acoplamento e pelo tanto a estabelecer a identidade do açúcar.

A reação do composto J55\_C8 com anidrido acético em piridina forneceu o derivado peracetilado J55\_C8PA, o qual foi utilizado para se estabelecer a estereoquímica relativa dos resíduos de açúcar, pela análise das constantes de acoplamento (Tabela 5.6). Interpretação dos espectros de RMN mono e bidimensionais, corroborou as subestruturas e a conectividade anteriormente estabelecidas. O valor das constantes de acoplamento  $J_{H2^{\circ}-H3^{\circ}}$ ,  $J_{H3^{\circ}-H4^{\circ}}$  e  $J_{H4^{\circ}-H5^{\circ}}$  em torno de 10 Hz, confirmou a identidade deste resíduo como sendo a  $\alpha$ -glicose, devido à constante  $J_{H1^{\circ}-H2^{\circ}}$  de 3,8 Hz indicativa de uma disposição equatorial do próton anomérico. A constante  $J_{H1^{\circ}-H2^{\circ}}$  de 1,5 Hz confirmou a configuração  $\alpha$  da outra subunidade de açúcar. As constantes  $J_{H2^{\circ}-H3^{\circ}}$  de 3,8 Hz,  $J_{H3^{\circ}-H4^{\circ}}$  de 9,7 Hz e  $J_{H4^{\circ}-H5^{\circ}}$  de 10,0 Hz indicaram uma disposição equatorial-axial, axial-axial e axial-axial, respectivamente, o que evidenciou que o segundo resíduo de açúcar correspondia à  $\alpha$ -manose. Portanto, a análise dos dados de RMN do derivado peracetilado identificou o glicoglicerolipídeo como 1-[ $\alpha$ -glucopiranosil-( $1 \rightarrow 3$ )-(6-O-acil- $\alpha$ -manopiranosil)]-glicerol (Figura 5.18).

Tabela 5.6 — Dados espectroscópicos de RMN do derivado peracetilado J55\_C8PA (CDCl<sub>3</sub>; ¹H em 600 MHz, ¹³C em 150 MHz).

	Pos.	$\delta_{\rm C}$ , tipo	$\delta_{H}$ ( $J$ em Hz)	COSY	НМВС
Aglicona	1	173,6 C	_	_	_
	2	34,2 CH <sub>2</sub>	2,35 (m)	3	1, 3, 4
	3	25,0 CH <sub>2</sub>	1,64 (q, 7,4)	2, 4	1, 2, 4
	4	29,4 CH <sub>2</sub>	1,32 (m)	3	-
	5-10	27,3-30-2	1,26	-	-
	11	36,8 CH <sub>2</sub>	a-1,26	12	-
			b-1,08	12	-
	12	34,6 CH	1,30 (m)	11, 15	14, 15
	13	29,8 CH <sub>2</sub>	a-1,33	14	11, 12, 14, 15
			b-1,12	14	11, 12, 14, 15

	14	11,6 CH <sub>3</sub>	0.86 (t, 7,3)	13	12, 15
	15	19,4 CH <sub>3</sub>	0,84 (d, 6,3)	12	11, 12
Glicose	1'	96,7 CH	5,26 (d, 3,8)	2'	3', 5', 3"
	2'	70,9 CH	4,78 (dd, 3,6-9.7)	1', 3'	1', 3', 4'
	3'	69,4 CH	5,35 (t, 10.0)	2', 4'	1', 2', 4'
	4'	68,2 CH	5,04 (t, 9,9)	3', 5'	3', 5', 6'
	5'	68,4 CH	4,10 (m)	4'	1', 3', 4'
	6'	61,9 CH <sub>2</sub>	a-4,30 (dd, 4,4-12,3)	6b'	4', 5'
			b-4,05 (dd, 2,3-12,3)	6a'	4', 5'
Manose	1"	97,8 CH	4,84 (d, 1,5)	1"	2", 3", 5", 1"
	2"	70,6 CH	5,20 (dd, 1,6-3,8)	1", 3"	1", 3", 4"
	3"	72,7 CH	4,18 (dd, 3,6-9,7)	2", 4"	2", 4", 1'
	4"	68,2 CH	5,29 (t, 10.0)	3", 5"	3", 5"
	5"	69,1 CH	3,83 (m)	4", 6a", 6b"	-
	6"	62,4 CH <sub>2</sub>	a-4,19 (dd, 5.6-12,2)	5", 6b"	4", 5", 1
			b-4,08 (dd, 2,8-12,3)	5", 6a"	4", 1
Glicerol	1"	66,4 CH <sub>2</sub>	a-3,80 (dd, 4.6-10,9)	1b"', 2"	2", 3", 1"
			b-3,64 (dd, 6,0-10,9)	1a"', 2"	2", 3", 1"
	2"	70,0 CH	5,21 (m)	1a'", 1b'", 3a'", 3b'"	1"', 3"'
	3""	62,4 CH <sub>2</sub>	a-4,32 (dd, 4,1-12,0)	2"', 3b"'	1"', 2"'
			b-4,15 (dd, 5,8-11,9)	2"', 3a"'	1"', 2"

Figura 5.18 — Estrutura do composto J55\_C8 (R = H) e o derivado peracetilado J55\_C8PA (R = Ac).

A análise de fragmentação do íon [M + H]<sup>+</sup> de m/z 641,3733 por espectrometria de massas de alta resolução em tandem (HRMS-MS), confirmou a estrutura do composto. O espectro apresentou os íons fragmento m/z 549,3217 [M - glicerol]<sup>+</sup> (calculado m/z 549,3275, erro 10,6 ppm), m/z 479,3220 [M - glicose + H<sub>2</sub>O] <sup>+</sup> (calculado m/z 479,3220, erro 0,0 ppm), m/z 461,3117 [M - glicose]<sup>+</sup> (calculado m/z 461,3114, erro -0,6 ppm) e m/z 387,2766 [M - glicose - glicerol]<sup>+</sup> (calculado m/z 387,2747, erro -4,9 ppm) (Figura 5.19).

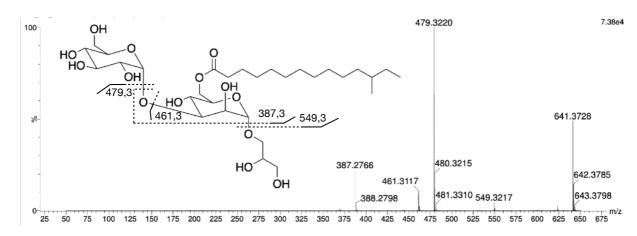
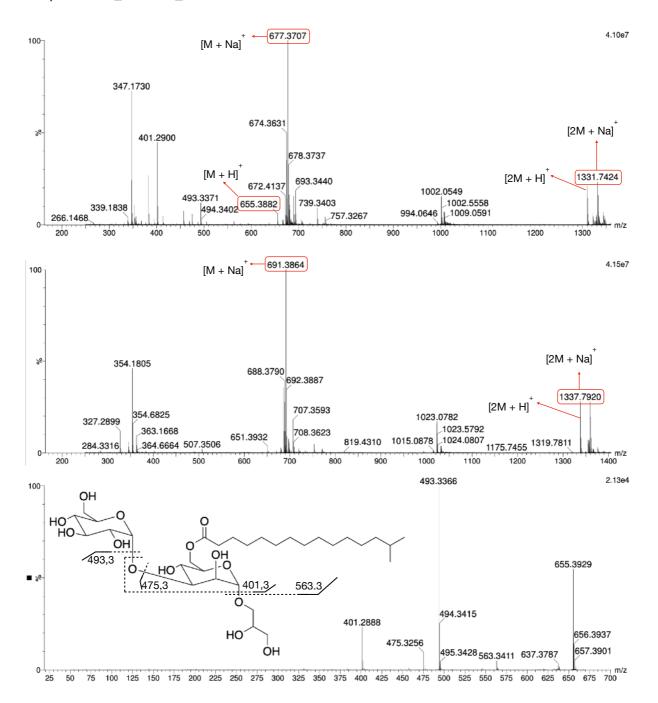


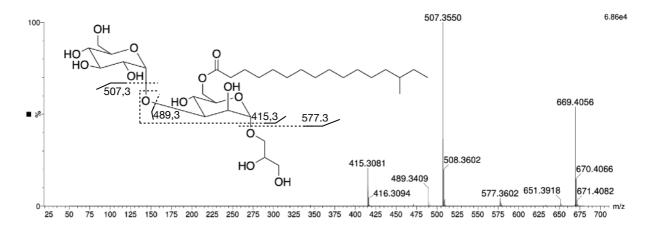
Figura 5.19 — Espectro de massas de fragmentação do composto J55\_C8.

A análise dos espectros de RMN dos compostos J55\_C9 e J55\_C10, bem como dos seus respectivos derivados peracetilados, J55\_C9PA e J55\_C10PA, indicaram que estes compostos apresentavam o mesmo esqueleto 1-[ $\alpha$ -glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)-(6-O-acil- $\alpha$ -manopiranosil)]-glicerol do composto J55\_C8 (ver apêndice). Porém, os dois compostos apresentaram diferentes cadeias alifáticas. No caso do composto J55\_C9 o espectro de HSQC indicou dupleto típico de uma cadeia alifática *iso* ( $\delta$ <sub>H</sub> 0,88,  $\delta$ <sub>C</sub> 23,8). No composto J55\_C10, foram observadas a metila tripleto ( $\delta$ <sub>H</sub> 0,88,  $\delta$ <sub>C</sub> 11,9) e a metila dupleto ( $\delta$ <sub>H</sub> 0,86,  $\delta$ <sub>C</sub> 19,8) características de uma cadeia *anteiso*.

A análise de HRMS do composto J55\_C9 forneceu os íons [M + H]<sup>+</sup> em m/z 655,3882 (calculado m/z 655,3905, erro 3,5 ppm) e [M + Na]<sup>+</sup> em m/z 677,3707 (calculado m/z 677,3724, erro 2,5 ppm), consistentes com a fórmula molecular C<sub>31</sub>H<sub>58</sub>O<sub>14</sub>. Para o composto J55\_C10 a análise de HRMS forneceu os íons [M + H]<sup>+</sup> em m/z 669,4041 (calculado m/z 669,4061, erro 3,0 ppm) e [M + Na]<sup>+</sup> em m/z 691,3864 (calculado m/z 691,3881, erro 2,4 ppm), consistentes com uma fórmula molecular C<sub>32</sub>H<sub>60</sub>O<sub>14</sub>. Esses resultados confirmaram que J55\_C9 e J55\_C10 continham um e dois CH<sub>2</sub> adicionais na cadeia alifática comparados com J55\_C8, respectivamente. As análises de HRMS/MS de cada um destes compostos validaram as estruturas propostas (Figura 5.20).

Figura 5.20 — Espectros de massas de alta de alta resolução (a) e de fragmentação (b) dos compostos J55\_C9 e J55\_C10.





A análise por HRMS do composto J55\_C11 apresentou o íon [M + Na]<sup>+</sup> em m/z 691,3864 (calculado m/z 691,3881, erro 2,4 ppm) para uma fórmula molecular C<sub>32</sub>H<sub>60</sub>NaO<sub>14</sub> o que indicou que tratava-se de um isômero do composto J55\_C10. Análises dos espectros de RMN mostraram que J55\_C11 apresenta as mesmas unidades de açúcar, glicerol e do ácido graxo (Tabelas 5.7 e 5.8). No entanto, uma correlação intensa  $^3J_{\text{CH}}$  H<sub>2</sub>3"'/C1, indicou que neste composto o ácido graxo encontra-se ligado na posição 3" do glicerol, estabelecendo a estrutura do composto como 1-[ $\alpha$ -glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -manopiranosil]-3-O-acilglicerol. Além disso, o deslocamento dos hidrogênios geminais H<sub>2</sub>6" ( $\delta$ <sub>H</sub> 3,84 e 3,73) indicavam que a posição 6' não estava substituída.

Tabela 5.7 — Dados espectroscópicos de RMN do composto J55\_C11 (MeOH  $d_4$ ; <sup>1</sup>H em 600 MHz, <sup>13</sup>C em 150 MHz).

	Pos.	$\delta_{\rm C}$ , tipo	δ <sub>H</sub> ( <i>J</i> em Hz)	COSY	НМВС
Aglicona	1	175,6 C	_	_	_
	2	35,1 CH <sub>2</sub>	2,36 (t, 7,6)	3	1, 3, 4
	3	26,1 CH <sub>2</sub>	1,62 (m)	2, 4	1, 2, 4
	4	30,4 CH <sub>2</sub>	1,33	3	_
	5-12	28,4-31,2 CH <sub>2</sub>	1,29	_	_
	13	38,0 CH <sub>2</sub>	1,30 / 1,10	_	_
	14	35,8 CH	1,30 (m)	15, 17	16, 17

	15	30,8 CH <sub>2</sub>	1,35 / 1,14	14, 16	13, 14, 16, 17
	16	11,9 CH <sub>3</sub>	0,88 (t, 7,4)	15	14, 15
	17	19,8 CH <sub>3</sub>	0,86 (d, 6,6)	14	13, 14, 15
Glicose	1'	102,2 CH	5,11 (d, 3,9)	2'	2', 3', 5', 3"
	2'	74,2 CH	3,41 (dd, 3,9-9,8)	1', 3'	1', 3', 4'
	3'	75,3 CH	3,69 (t, 9,4)	2', 4'	1', 2', 4', 5'
	4'	72,1 CH	3,24 (dd, 9,1-9,8)	3', 5'	2', 3', 5', 6'
	5'	74,2 CH	3,88 (m)	4', 6b'	1', 3', 4', 6'
	6'	62,9 CH <sub>2</sub>	a-3,86 (m)	6b'	4'
			b-3,64 (dd, 6,5-11,6)	5', 6a'	4', 5'
Manose	1"	102,3 CH	4,77 (d, 1,8)	2"	2", 3", 5", 1"
	2"	71,3 CH	4,12 (dd, 1,9-2,9)	1", 3"	1", 3", 4"
	3"	82,0 CH	3,82 (m)	2"	2", 4", 1'
	4"	67,5 CH	3,85 (m)	-	3", 5", 6"
	5"	74,9 CH	3,59 (m)	6a", 6b"	1", 3", 4", 6"
	6"	62,9 CH <sub>2</sub>	a-3,84 (m)	5", 6b"	4"
			b-3,73 (dd, 5,7-11,8)	5", 6a"	4", 5"
Glicerol	1"'	69,8 CH <sub>2</sub>	a-3,78 (dd, 4,8-10,3)	1b"', 2"'	2", 3", 1"
			b-3,46 (dd, 6,2-10,3)	1a'", 2'"	2"', 3"', 1"
	2"'	69,6 CH	3,98 (m)	1a"', 1b"', 3a"', 3b"'	1"', 3"'
	3"'	66,6 CH <sub>2</sub>	a-4,16 (dd, 4,4-11,4)	2"', 3b"'	1"', 2"', 1
			b-4,08 (dd, 6,0-11,4)	2", 3a"	1"', 2"', 1

Tabela 5.8 — Dados espectroscópicos de RMN do composto J55\_C11 peracetilado (CDCl $_3$ ;  $^1\mathrm{H}$  em 600 MHz,  $^{13}\mathrm{C}$  em 150 MHz).

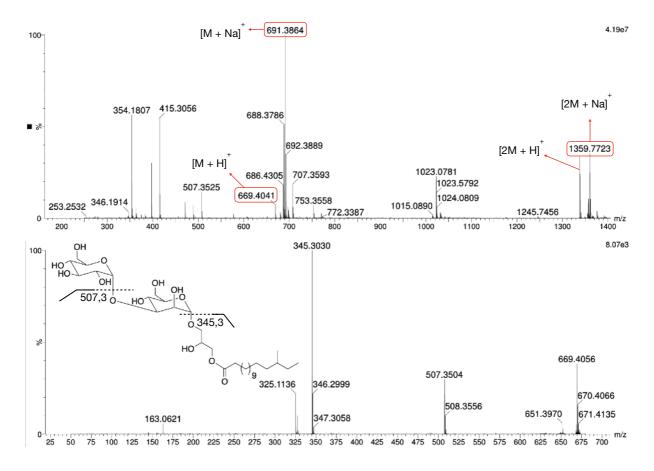
	Pos.	δ <sub>C</sub> , mult.	$\delta_{H}$ ( $J$ em Hz)	COSY	НМВС
Aglicona	1	173,4 C	_	_	_
	2	34,2 CH <sub>2</sub>	2,32	3	1, 3, 4
	3	25,0 CH <sub>2</sub>	1,62	2, 4	1, 2, 4
	4	29,3 CH <sub>2</sub>	1,32	3	_
	5-12	28,4-31,2 CH <sub>2</sub>	1,29	_	_
	13	37,3 CH <sub>2</sub>	1,27 / 1,08	_	14
	14	34,6 CH	1,30	_	_
	15	29,7 CH <sub>2</sub>	1,34 / 1,13	_	16, 17
	16	11,6 CH <sub>3</sub>	0,86	_	14, 15
	17	19,4 CH <sub>3</sub>	0,84	_	13, 14, 15
Glicose	1'	96,7 CH	5,26 (d, 3,8)	2'	3', 5', 3"
	2'	71,0 CH	4,78 (dd, 3,8-10,3)	1', 3'	1', 3'
	3'	69,4 CH	5,35 (t, 10,0)	2', 4'	1', 2', 4'
	4'	68,2 CH	5,04 (t, 10,0)	3', 5'	3', 5', 6'
	5'	68,4 CH	4,10 (m)	4'	1',4'
	6'	61,9 CH <sub>2</sub>	a-4,30 (dd, 4,4-12,4)	6b'	4', 5'
			b-4,05 (dd, 2,3-12,4)	6a'	4', 5'
Manose	1"	97,9 CH	4,84 (d, 1,32)	2"	2", 3", 5", 1"
	2"	70,6 CH	5,21 (m)	1", 3"	1", 3", 4"
	3"	72,7 CH	4,18 (dd, 3,6-9,7)	2", 4"	2", 4", 1'
	4"	68,2 CH	5,30 (t, 10,0)	3", 5"	3", 5", 6"
	5"	69,0 CH	3,84 (m)	4", 6a", 6b"	1", 3", 4"
	6"	62,6 CH <sub>2</sub>	a-4,21 (dd, 5,6-12,3)	5", 6b"	-
			b-4,06 (dd, 2,7-12,3)	5", 6a"	4"
Glicerol	1"	66,6 CH <sub>2</sub>	a-3,81 (dd, 4,3-10,9)	1b"', 2"'	2", 3", 1"
			b-3,65 (dd, 6,0-10,9)	1a"', 2"'	2"', 3"', 1"

2"	70,1 CH	5,21 (m)	1a"', 1b"', 3a"', 3b"	1"', 3"'
3"	62,2 CH <sub>2</sub>	a-4,33 (dd, 4,1-12,0)	3b"", 2""	1"', 2"', 1
		b-4,15 (dd, 5,9-12,0)	3a"', 2'"	1"', 2"',1

Fonte: autoria própria.

As análises de fragmentação do composto J55\_C11 por HRMS/MS, confirmou a ligação da cadeia do ácido graxo pelo fragmento [M - glicose - manose]<sup>+</sup> em *m/z* 345,3030 (calculado *m/z* 345,3005, erro 7,2 ppm). Adicionalmente apresentou o íon [M - glicose]<sup>+</sup> em *m/z* 507,3504 (calculado *m/z* 507,3533, erro 5,7 ppm) (Figura 5.21).

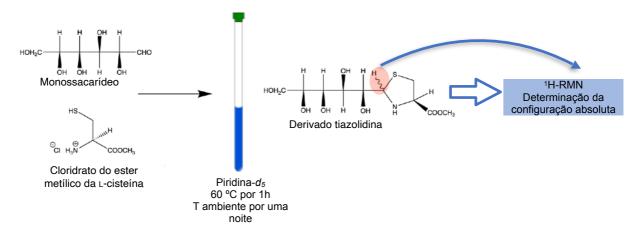
Figura 5.21 — Espectros de massas de alta resolução (a) e de fragmentação (b) do composto J55\_C11.



Fonte: autoria própria.

Uma vez determinadas inequivocamente as estruturas dos compostos isolados, foi necessário estabelecer a configuração absoluta dos resíduos de açúcar presentes nos compostos. Implementou-se uma metodologia desenvolvida recentemente para determinação da estereoquímica absoluta de enantiômeros de açúcar por <sup>1</sup>H-RMN (INAGAKI et al., 2021). Descrita na figura 5.22, a metodologia consiste na obtenção de derivados da tiazolidina dos monossacarídeos livres por reação com o cloridrato do éster metílico da L-cisteína, a qual é realizada diretamente no tubo de RMN em piridina deuterada, obtendo-se uma mistura epimérica dos derivados de tiazolidina de cada açúcar.

Figura 5.22 — Procedimento de derivatização *in situ* no tubo de RMN de açúcares com o cloridrato do éster metílico da L-cisteína.

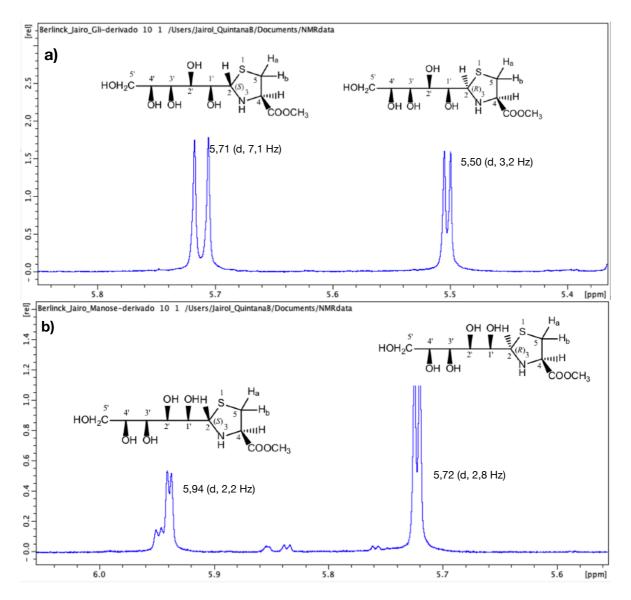


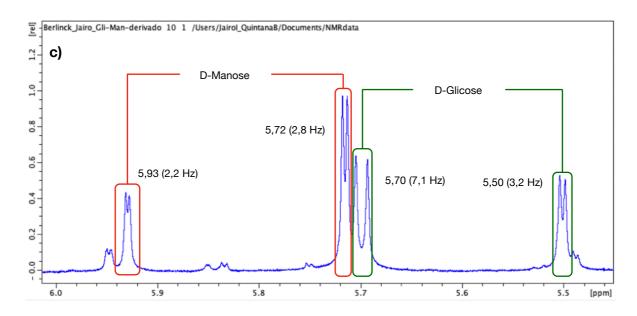
Fonte:adaptado de INAGAKI et al. 2021.

Os derivados de tiazolidina preparados de acordo com a metodologia descrita por Inagaki et al. (2021) apresentam um par de sinais característicos de cada um dos epímeros obtidos, atribuídos aos hidrogênios H-2 dos açúcares. Esses dupletos com deslocamentos químicos entre  $\delta_{\rm H}$  5,5-6,0 ppm e constantes de acoplamento escalar  $J_{\rm HH}$  entre 2,0-7,5 Hz, são *enantio*-dependentes da configuração D- ou L- de cada açúcar, o que permite distingui-los perfeitamente um de outro. O derivado da D-glicose apresentou os dois sinais em  $\delta_{\rm H}$  5,71 (d, J = 7,1 Hz) e  $\delta_{\rm H}$  5,50 (d, J = 3,2 Hz). No caso do derivado da D-manose, os sinais H-2 apareceram em  $\delta_{\rm H}$  5,94 (d, J = 2,2 Hz) e  $\delta_{\rm H}$  5,72 (d, J = 2,8 Hz). Os resultados obtidos para os padrões foram comparados com os reportados (INAGAKI et al., 2021) e coincidiram muito bem.

Posteriormente, foi realizada a derivatização da mistura 1:1 de D-glicose e D-manose com o intuito de comprovar se os dois açúcares eram diferençáveis (Figura 5.23).

Figura 5.23 — Ampliação dos espectros de  $^1$ H-RMN (600 MHz, Piridina  $d_5$ ) na região dos sinais H-2 dos derivados tiazolidina realizados para: a) a D-glicose, b) a D-manose, e c) a mistura de D-glicose e D-manose.





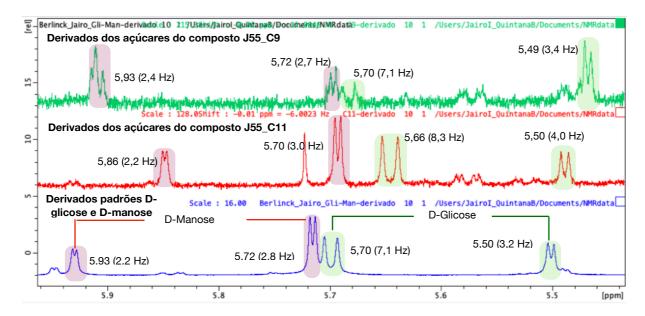
Fonte: autoria própria.

Como as análises de <sup>1</sup>H-RMN da mistura de D-glicose e D-manose permitiram diferenciar os dois açúcares derivatizados, a metodologia foi empregada na determinação da configuração absoluta dos resíduos de açúcar dos glicolipídeos isolados. Foram preparados os derivados de tiazolidina da mistura dos açúcares obtida a partir da hidrólise ácida dos glicolipídeos isolados segundo o procedimento previamente indicado. A análise dos sinais característicos H-2 no espectro de <sup>1</sup>H-RMN da mistura dos açúcares dos compostos J55\_C9 e J55\_C11 comparados com a mistura dos padrões, permitiu estabelecer sem ambiguidade a presença de D-glicose e D-manose nos compostos produzidos pela bactéria (Figura 5.24).

Os derivados de tiazolidina dos compostos J55\_C8 e J55\_C10 degradaram e não foi possível fazer a determinação da configuração absoluta dos açúcares por esse método. Todavia, levando-se em conta os valores praticamente idênticos dos deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C dos glicoglicerolipídeos naturais, como dos derivados peracetilados, além de os valores próximos de rotação ótica bem próximos aos valores dos compostos J55\_C9 e J55\_C11, permitem afirmar que os compostos J55\_C8 e J55\_C10 também contém D-glicose e D-manose. Assim, as estruturas dos compostos isolados foram estabelecidas como 1-[ $\alpha$ -D-glucopiranosil-( $1\rightarrow3$ )-(6-O-12-metiltetradecanoil— $\alpha$ -D-manopiranosil)]-glicerol para J55\_C8, 1-[ $\alpha$ -D-glucopiranosil-( $1\rightarrow3$ )-(6-O-14-metilpentadecanoil— $\alpha$ -D-manopiranosil)]-glicerol para

J55\_C9, 1-[ $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)-(6-O-14-metilhexadecanoil— $\alpha$ -D-manopiranosil)]-glicerol para J55\_C10 e 1-[ $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)-( $\alpha$ -D-manopiranosil)]-3-O-14-metilhexadecanoil-glicerol para J55\_C8 (Figura 5.25).

Figura 5.24 — Comparação dos sinais H-2 dos derivados de tiazolidina dos açúcares dos compostos J55\_C9 e J55\_C11 com os dos padrões de D-glicose e D-manose.



Fonte: autoria própria.

Figura 5.25 — Estruturas completas dos glicoglicerolipídeos inéditos isolados a partir do meio de cultivo da linhagem de bactéria *Microbacterium testaceum* J55, isolada da esponja *T. brasiliensis*.

Fonte: autoria própria.

**J55\_C8**: sólido incolor;  $[\alpha]^{25}_D$  +59,8 (*c* 0,002, CHCl<sub>3</sub>); IR (pastilha de Si)  $v_{max}$  3360, 1620 cm<sup>-1</sup>; dados de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C tabela 2. ESIMS m/z 641,3733 [M + H]<sup>+</sup> (calculada para  $C_{30}H_{57}O_{14}$  m/z 641,3748, erro -1,7 ppm).

**J55\_C9**: sólido incolor; [ $\alpha$ ]<sup>25</sup><sub>D</sub> +60,5 (c 0,004, CHCl<sub>3</sub>); IR (pastilha de Si)  $v_{max}$  3300, 1650 cm<sup>-1</sup>; dados de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C tabela S1. ESIMS m/z 655,3882 [M + H]<sup>+</sup> (calculada para C<sub>31</sub>H<sub>58</sub>O<sub>14</sub> m/z 655,3905, erro 3,5 ppm).

**J55\_C10**: sólido incolor; [ $\alpha$ ]<sup>25</sup><sub>D</sub> +62,5 (c 0,004, CHCl<sub>3</sub>); IR (pastilha de Si)  $v_{max}$  3320, 1640 cm<sup>-1</sup>; dados de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C tabela S1. ESIMS m/z 669,4041 [M + H]<sup>+</sup> (calculada para C<sub>32</sub>H<sub>60</sub>O<sub>14</sub> m/z 669,4061, erro 3,0 ppm).

**J55\_C11**: sólido incolor;  $[\alpha]^{25}_D$  +57,7 (*c* 0,004, CHCl<sub>3</sub>); IR (pastilha de Si)  $v_{max}$  3350, 1610 cm<sup>-1</sup>; dados de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C tabela 4. ESIMS m/z 691,3864,  $[M + Na]^+$  (calculada para  $C_{32}H_{60}O_{14}$  m/z 691,3881, erro 2,4 ppm).

Os compostos J55\_8, J55\_C9 e J55\_C10 não foram ativos no bioensaio contra *Plasmodium falciparum*. A avaliação da atividade biológica destes compostos nos bioensaios anticâncer e anti-*Leishmania* estão atualmente em andamento.

Em conjunto, os dados de redes moleculares e análises em bioensaios permitiram implementar uma abordagem guiada por espectrometria de massas para o isolamento dos metabólitos secundários de interesse. Glicoglicerolipídeos com o esqueleto 1-[a-glicopiranosil-(1→3)-a-manopiranosil]-glicerol monoacilados são reportados neste trabalho pela primeira vez. A desreplicação pela fórmula molecular e a massa acurada nas bases de dados *Natural Products Atlas* (VAN SANTEN et al., 2019) e *Dictionary of Natural Products* (https://dnp.chemnetbase.com), além da consulta detalhada na literatura, não encontrou essas estruturas reportadas previamente. Estes se caracterizam pela monoacilação na posição 6" ou 3", em comparação com os glicoglicerolipídeos reportados até a presente data que possuem idêntico esqueleto polar, isolados de meios de cultivo da bactéria Gram negativa *Flavobacterium marinotypicum* (YAGI e MARUYAMA, 1999) e da bactéria Gram positiva *Microbacterium* sp. associada à esponja marinha *Halichondria panicea* (WICKE et al. 2000), os quais estão acilados em ambas posições.

Não existem artigos na literatura de produtos naturais isolados de cultivos da espécie *Microbacterium testaceum*. Este trabalho é o primeiro que reporta metabólitos desta espécie. A pesar de pertencer às Actinobacterias, o metabolismo secundário de bacterias do gênero *Microbacterium* não tem sido amplamente investigado (Figura 5.26). Além dos glicoglicerolipídeos GGL.1, GGL.2, GGL.3 e GGL.4 reportados da espécie *Microbacterium* sp. (WICKE et al. 2000), os peptaibóis microbacterinas A e B foram isolados do meio de cultura da espécie *M. sediminis* sp.

nov. YLB-01(T) isolada do fundo marinho (LIU et al. 2015). Duas novas α-pironas, as micropironas A e B foram isoladas do meio de cultivo da bactéria *Microbacterium* sp. GJ312, a qual foi isolada da planta Glycyrrhiza uralensis (XU et al. 2021). Outros trabalhos identificaram a produção de carotenoides neste gênero e investigado o seu papel como mecanismo de adaptação a condições ambientais extremas (REIS-MANSUR et al. 2019; MANDAKOVIC et al. 2020). Um estudo genômico comparativo de 70 genomas de 20 espécies diferentes de Microbacterium sobre o potencial de produção de metabólitos secundários, encontrou terpeno sintases (em 96% dos genomas analisados), policetídeo síntase do tipo III (79%) e peptídeos nãoribosomais sintetases (64%) como os gene clusters mais comuns nos genomas destas bactérias. Além disso, outros gene clusters envolvidos na biossíntese de sideróforos, bacteriocinas, butirolactonas e peptídeos ribossomais modificados póstraducionalmente (RiPP Ribosomally synthetized and Post-translationally modified peptides) também foram identificados (CORRETTO et al. 2020), demonstrando que apesar do seu menor genoma, em comparação com outras Actinobacterias, possuem capacidades biossintéticas interessantes que podem motivar desenvolver estudos mais aprofundados sobre o metabolismo secundário de bacterias pertencentes a este gênero.

Figura 5.26 — Metabólitos secundários isolados do meio de cultivo de bactérias do gênero *Microbacterium* sp.

Fonte: autoria própria.

Glicoglicerolipídeos foram isolados de meios de cultivo bactérias de diferentes origens como por exemplo do patógeno Rothia mucilaginosa (PASCIAK et al. 2004), de bactérias associadas às esponjas marinhas como Bacillus pumilus (RAMM et al. 2004), Microccocus luteus (PAKKIRI et al. 2004), ou da bactéria marinha Bacillus licheniformis 09IDYM23 (TAREQ et al. 2015), com estruturas amplamente conservadas. Compostos desta classe também foram isolados de meios de crescimento de cianobactérias (SHIRAHASHI et al. 1993), algas (MORIMOTO et al. 1995), líquens (SASSAKI et al. 1999) e organismos marinhos (CHENG-SÁNCHEZ e SARABIA, 2018). Os glicoglicerolipídeos são produtos naturais de uma grande diversidade química, gerada a partir dos diferentes tipos de açúcar que podem constituir a parte polar da estrutura, a localização da ligação glicosídica entre eles, e o tipo de ácido graxo presente na estrutura guímica da molécula. As características anfifilicas destes compostos lhes conferem interessantes propriedades para interagir com diferentes alvos biológicos possibilitando apresentarem diversas atividades biológicas. Por exemplo, alguns glicoglicerolipídeos apresentam atividade citotóxica (HOU et al. 2007), antiviral (LOYA et al. 1998), anti-inflamatória (BERGÉ et al. 2002), e antifúngica (IGARASHI et al. 2017).

#### 6. CONCLUSÕES

Foram isoladas 87 linhagens bacterianas a partir da esponja marinha *T. brasiliensis* com o intuito de verificar, através de uma abordagem dependente de cultivo, se a pseudoceratidina e os seus derivados bromados eram de origem microbiana ou não. Assim, do desenvolvimento da primeira parte do trabalho pôdese concluir que:

- As análises por UPLC-MS/MS dos extratos indicaram que as bactérias isoladas, sob as condições de crescimento e extração empregadas, não produzem os derivados bromados da pseudoceratidina. No entanto, a comparação manual das análises dos extratos dos meios de cultivo das 85 bactérias analisadas com o respectivo controle negativo do extrato do meio de cultivo, permitiu identificar 27 linhagens que apresentaram perfis metabólicos de destaque. Estas produziram extratos cujos perfis indicaram picos diferentes dos componentes meio de cultivo. Os extratos dos meios de cultivo destas 27 bactérias foram submetidos a análises de desreplicação.
- A extração dos metabólitos secundários produzidos pelas 27 linhagens de bactérias selecionadas empregando-se a mistura das resinas XAD-2, XAD-4 e XAD-7HP foi maior quando as resinas foram colocadas desde o início do crescimento destas linhagens. Os perfis cromatográficos desses extratos apresentaram maior diversidade de compostos. No entanto, foram observados muitos componentes do meio de cultivo em todas as frações de todos os extratos obtidos, o que acabou dificultando o processo de purificação. O fato de compostos serem detectados por espectrometria de massas não indica necessariamente a presença destes compostos em quantidades suficientes para o seu isolamento, uma vez que a detecção está relacionada com a facilidade de ionização dos compostos detectados.
- Os dados obtidos do sequenciamento do gene 16S das três linhagens selecionadas mostram que a linhagem *Vibrio* sp. J17 e as linhagens *Ruegeria* sp. J15 e *Ruegeria* sp. J49 são de origem marinha pelo fato estes gêneros de bactérias serem típicos deste ambiente. Estes resultados também concordam com

resultados de análise metagenômica realizados com *T. brasiliensis* (RUA et al. 2018).

• A investigação química dos extratos dos meios de cultivo das linhagens *Vibrio* sp. J17 e *Ruegeria* sp. J49 foi dificultada devido à presença de componentes do meio de cultivo durante todo o processo de purificação. A dificuldade em se isolar compostos a partir dos meios de cultivo destas duas linhagens muito provavelmente foi também foi devido às características próprias destas linhagens para produzir metabólitos secundários. O sequenciamento e análises dos respectivos genomas indicou limitadas capacidades biossintéticas, além das restritas condições de cultivo empregadas.

O isolamento de compostos a partir das linhagens bacterianas isoladas da esponja marinha *Tedania brasiliensis* foi desafiador desde o início, uma vez que a abordagem inicial de cultivo numa única condição e a metodologia de escolha das linhagens mais promissoras não levaram aos resultados esperados.

É fato bem conhecido que a "domesticação" de micro-organismos isolados de ambientes naturais em condições de laboratório, não permite, na maioria dos casos, a expressão gênica relacionada aos compostos que linhagens selvagens são capazes de produzir. A complexidade dos ecossistemas microbianos, interações simbióticas ou ambientais, são provavelmente algumas das causas deste inconveniente.

Abordagens que permitam um estudo mais amplo e diversificado do metabolismo de micro-organismos cultiváveis vem se implementado recentemente. A avaliação de diferentes condições de cultivo da linhagem bacteriana codificada como *Microbacterium testaceum* J55 e posterior análise metabolômica comparativa, permitiu estabelecer o meio de cultivo líquido YEME como o meio no qual a bactéria *Microbacterium testaceum* J55 produz uma maior diversidade química de metabólitos secundários. Este resultado a partir de análises metabolômicas foi respaldado pelos resultados dos ensaios da atividade biológica, nos quais uma fração deste extrato foi a mais ativa em três dos quatro bioensaios avaliados.

Desta maneira, o estudo químico do extrato orgânico proveniente do cultivo da linhagem bacteriana *Microbacterium testaceum* J55 em meio líquido YEME permitiu o isolamento e identificação de 4 novos glicoglicerolipídeos. Este é o primeiro reporte de metabólitos secundários para esta espécie bacteriana. Isso demostra que a abordagem OSMAC (*One Strain, MAny Compounds*), em conjunto com análises metabolômicas, é uma alternativa viável para acessar em maior extensão às capacidades biossintéticas de um micro-organismo, e otimizar o trabalho em tempo e recursos na descoberta de moléculas inéditas.

### 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELMOHSEN, U. R.; BAYER, K.; HENTSCHEL, U. Diversity, abundance and natural products of marine sponge-associated actinomycetes. **Natural Product Reports,** Cambridge, v. 31, n. 3, p. 381–399, 2014.

AGARWAL, V.; BLANTON, J. M.; PODELL, S.; TATON, A.; SCHORN, M. A.; BUSCH, J.; LIN, Z.; SCHMIDT, E. W.; JENSEN, P. R.; PAUL, V. J.; BIGGS, J. S.; GOLDEN, J. W.; ALLEN, E. E.; MOORE, B. S. Metagenomic discovery of polybrominated diphenyl ether biosynthesis by marine sponges. **Nature Chemical Biology**, London, v. 13, n. 5, p. 537–543, 2017.

AL-MOURABIT, A.; ZANCANELLA, M. A.; TILVI, S.; ROMO, D. Biosynthesis, asymmetric synthesis, and pharmacology, including cellular targets, of the pyrrole-2-aminoimidazole marine alkaloids. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 28, n. 7, p. 1229–1260, 2011.

ALVES, A.; CORREIA, A.; IGUAL, J. M.; TRUJILLO, M. E. *Microbacterium endophyticum* sp. nov. and *Microbacterium halimionae* sp. nov., endophytes isolated from the salt-marsh plant *Halimione portulacoides* and emended description of the genus *Microbacterium*. **Systematic and Applied Microbiology**, Munich, v. 37, n. 7, p. 474–479, 2014.

ANDERSEN, R. J.; WOLFE, M. S.; FAULKNER, D. J. Autotoxic antibiotic production by a marine Chromobacterium. **Marine Biology**, Berlin, v. 27, n. 4, p. 281–285, 1974.

ANDRADE, P.; WILLOUGHBY, R.; POMPONI, S. A.; KERR, R. G. Biosynthetic studies of the alkaloid, stevensine, in a cell culture of the marine sponge *Teichaxinella morchella*. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v. 40, n. 26, p. 4775–4778, 1999.

APPOLINARIO, L. R.; TSHOEKE, D A.; RUA, C. P. J.; VENAS, T.; CAMPEÃO, M. E.; AMARAL, G. R. S.; LEOMIL, L.; DE OLIVEIRA, L.; VIEIRA, V. V.; OTSUKI, K.; SWINGS, J.; THOMPSON, F.L.; THOMPSON, C C. Description of Endozoicomonas arenosclerae sp. nov. using a genomic taxonomy approach. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, Wageningen, v. 109, n. 3, p. 431–438, 2016.

ARON, A. T.; GENTRY, E. C.; MCPHAIL, K. L.; NOTHIAS, L. F.; NOTHIAS-ESPOSITO, M.; BOUSLIMANI, A.; PETRAS, D.; GAUGLITZ, J. M.; SIKORA, N.; VARGAS, F.; VAN DER HOOFT, J. J. J.; ERNST, M.; KANG, K. B.; ACEVES, C. M.; CARABALLO-RODRIGUEZ, A. M.; KOESTER, I.; WELDON, K. C.; BERTRAND, S.; ROULLIER, C.; SUN, K.; TEHAN, R. M.; BOYA, P. C. A.; CHRISTIAN, M. H.; GUTIÉRREZ, M.; ULLOA, A. M.; TEJEDA MORA, J. A.; MOJICA-FLORES, R.; LAKEY-BEITIA, J.; VÁSQUES-CHAVES, V.; ZHANG, Y.; CALDERÓN, A. I.; TAYLER, N.; KEYZERS, R. A.; TUGIZIMANA, F.; NDLOVU, N.; AKSENOV, A. A.; JARMUSCH, A. K.; SCHMID, R.; TRUMAN, A. W.; BANDEIRA, N.; WANG, M.; DORRESTEIN, P.

- C. Reproducible molecular networking of untargeted mass spectrometry data using GNPS. **Nature Protocols**, London, v. 15, n. 6, p. 1954–1991, 2020.
- ASSMANN, M.; VAN SOEST, R. W. M.; KÖCK, M. New antifeedant bromopyrrole alkaloid from the caribbean sponge *Stylissa caribica*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 64, n. 10, p. 1345–1347, 2001.
- ATANASOV, A. G.; ZOTCHEV, S. B.; DIRSCH, V. M.; THE INTERNATIONAL NATURAL PRODUCT SCIENCES TASKFORCE; SUPURAN, C. T. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**, London, v. 20, n. 3, p. 200–216, 2021.
- BAUERMEISTER, A.; MANNOCHIO-RUSSO, H.; COSTA-LOTUFO, L. V.; JARMUSCH, A. K.; DORRESTEIN, P. C. Mass spectrometry-based metabolomics in microbiome investigations. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 20, n. 3, p. 143–160, 2022.
- BENIDDIR, M. A.; KANG, K. B.; GENTA-JOUVE, G.; HUBER, F.; ROGERS, S.; VAN DER HOOFT, J. J. Advances in decomposing complex metabolite mixtures using substructure- and network-based computational metabolomics approaches. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 38, n. 11, p. 1967–1993, 2021.
- BENTLEY, S. D.; CHATER, K.F; CERDEÑO-TÁRRAGA, A. M.; CHALLIS, G. L.; THOMSON, N. R.; JAMES, K. D.; HARRIS, D. E.; QUAIL, M. A.; KIESER, H.; HARPER, D.; BATEMAN, A.; BROWN, S.; CHANDRA, G.; CHEN. C. W.; COLLINS, M.; CRONIN, A.; FRASER, A.; BOLGE, A.; HIDALGO, J.; HORNSBY, T.; HOWARTH, S.; HUANG, C. H.; KIESER, T.; LARKE, L.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; O`NEIL, S.; RABBINOWITSCH, E.; RAJANDREAM, M. A.; RUTHERFORD, K.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SAUNDERS, D.; SHARP, S.; SQUARES, S.; TAYLOR, K.; WARREN, T.; WIETZORREK, A.; WOODWARD, J.; BARRELL, B. G.; PARKHILL, J.; HOPWOOD, D. A. Complete genome sequence of the model actinomycete Streptomyces coelicolor A3(2). **Nature**, London, v. 417, n. 6885, p. 141–147, 2002.
- BERGÉ, J. P.; DEBITON, E.; DUMAY, J.; DURAND, P.; BARTHOMEUF, C. In vitro anti-inflammatory and anti-proliferative activity of sulfolipids from the red alga *Porphyridium cruentum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 21, p. 6227–6232, 2002.
- BERLINCK, R. G. S.; MONTEIRO, A. F.; BERTONHA, A. F.; BERNARDI, D. I.; GUBIANI, J. R.; SLIVINSKI, J.; MICHALISKI, L. F.; TONON, L. A. C.; VENANCIO, V. A.; FREIRE, V. F. Approaches for the isolation and identification of hydrophilic, light-sensitive, volatile and minor natural products. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 36, n. 7, p. 981–1004, 2019.
- BHUSHAN, A.; PETERS, E. E.; PIEL, J. Entotheonella Bacteria as Source of Sponge-Derived Natural Products: Opportunities for Biotechnological Production In: Müller, W.; Schröder, H.; Wang, X. (eds) Blue Biotechnology. Progress in Molecular and Subcellular Biology. New York, v. 55, 291–314, 2017.

- BICKMEYER, U. Bromoageliferin and dibromoageliferin, secondary metabolites from the marine sponge *Agelas conifera*, inhibit voltage-operated, but not store-operated calcium entry in PC12 cells. **Toxicon**, Oxford, v. 45, n. 5, p. 627–632, 2005.
- BLIN, K.; WOLF, T.; CHEVRETTE, M. G.; LU, X.; SCHWALEN, C. J.; KAUTSAR, S. A.; SUAREZ-DURAN, H. G.; DE LOS SANTOS, E. L. C.; SHELEST, E.; BREITLING, R.; TAKANO, E.; LEE, S. Y.; WEBER, T.; MEDEMA, M. H. AntiSMASH 4.0 improvements in chemistry prediction and gene cluster boundary identification.

  Nucleic Acids Research, Oxford, v. 45, n. W1, p. W36–W41, 2017.
- BLOCKLEY, A.; ELLIOT, D. R.; ROBERTS, A. P.; SWEET, M. Symbiotic microbes from marine invertebrates: Driving a new era of natural product drug discovery. **Diversity**, Basel, v. 9, n. 4, p. 1–13, 2017.
- BLUNT, J. W.; COPP, B R.; KEYZERS, R A.; MUNRO, M. H. G.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 34, n. 3, p. 235–294, 2017.
- BODE, H. B.; BETHE, B.; HÓFS, R.; ZEECK, A. Big effects from small changes: Possible ways to explore nature's chemical diversity. **ChemBioChem**, Weinheim, v. 3, n. 7, p. 619–627, 2002.
- BRAEKMAN, J. C.; DALOZE, D.; STOLLER, C.; VAN SOEST, R. W. M. Chemotaxonomy of *Agelas* (Porifera: Demospongiae). **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 20, n. 5, p. 417–431, 1992.
- BRINKMANN, C. M.; MARKER, A.; KURTBÖKE, D. I. An overview on marine sponge-symbiotic bacteria as unexhausted sources for natural product discovery. **Diversity**, Basel, v. 9, n. 4, 2017.
- BURKHOLDER, P. R.; PFISTER, R. M.; LEITZ, F. H. Production of a pyrrole antibiotic by a marine bacterium. **Applied microbiology**, Washington, v. 14, n. 4, p. 649–653, 1966.
- BUTLER, M. S.; ROBERTSON, A. A. B.; COOPER, M. A. Natural product and natural product derived drugs in clinical trials. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 31, n. 11, p. 1612–1661, 2014.
- CANTRELL, C. L.; DAYAN, F. E.; DUKE, S. O. Natural products as sources for new pesticides. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 75, n. 6, p. 1231–1242, 2012.
- CARROLL, A. R.; COPP, B. R.; DAVIS, R. A.; KEYZERS, R. A.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 38, n. 2, p. 362–413, 2021.
- CHANAS, B.; PAWLIK, J. R.; LINDEL, T.; FENICAL, W. Chemical defense of the Caribbean sponge *Agelas clathrodes* (Schmidt). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, Amsterdam, v. 208, n. 1–2, p. 185–196, 1997.

- CHAUHAN, A.; GREEN, S.; PATHAK, A.; THOMAS, J.; VENKATRAMANAN, R. Whole-genome sequences of five oyster-associated bacteria show potential for crude oil hydrocarbon degradation. **Genome Announcements**, Washington, v. 1, n. 5, p. 10–11, 2013.
- CHENG-SÁNCHEZ, I.; SARABIA, F. Chemistry and Biology of Bioactive Glycolipids of Marine Origin. **Marine drugs**, Basel, v. 16, n. 9, 2018.
- CHIMETTO, L. A.; BROCCHI, M.; GONDO, M.; THOMPSON, C.C.; GOMEZ-GIL, B.; THOMPSON, F. L. Genomic diversity of vibrios associated with the Brazilian coral *Mussismilia hispida* and its sympatric zoanthids (*Palythoa caribaeorum*, *Palythoa variabilis* and *Zoanthus solanderi*). **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 106, n. 6, p. 1818–1826, 2009.
- CHRISTIE-OLEZA, J. A.; ARMENGAUD, J. In-depth analysis of exoproteomes from marine bacteria by shotgun liquid chromatography-tandem mass spectrometry: The *Ruegeria pomeroyi* DSS-3 case-study. **Marine Drugs**, Basel, v. 8, n. 8, p. 2223–2239, 2010.
- CHU, M.-J.; LI, M.; MA, H.; LI, P. L.; LI, G. Q. Secondary metabolites from marine sponges of the genus *Agelas*: a comprehensive update insight on structural diversity and bioactivity. **RSC Advances**, Cambridge, v. 12, n. 13, p. 7789–7820, 2022.
- CICHEWICZ, R. H.; VALERIOTE, F. A.; CREWS, P. Psymberin, a potent spongederived cytotoxin from *Psammocinia* distantly related to the pederin family. **Organic Letters**, Washington, v. 6, n. 12, p. 1951–1954, 2004.
- CONDREN, A. R.; COSTA, M. S.; RIVERA-SANCHEZ, N.; KONKAPAKA, S.; GALLIK, K. L.; SAXENA, A.; MURPHY, B. T.; SANCHEZ, L. M. Addition of insoluble fiber to isolation media allows for increased metabolite diversity of lab-cultivable microbes derived from zebrafish gut samples. **Gut Microbes**, Philadelphia, v. 11, n. 4, p. 1064–1076, 2020.
- COOK, A. F.; BARTLETT, R. T.; GREGSON, R. P.; QUINN, R. J. 1-Methylisoguanosine, a Pharmacologically Active Agent from a Marine Sponge. **Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 45, n. 20, p. 4020–4025, 1980.
- CORRETTO, E.; ANTONIELLI, L.; SESSITSCH, A.; HÖFER, C.; PUSCHENREITER, M.; WIDHALM, S.; SWARNALAKSHMI, K.; BRADER, G.. Comparative Genomics of *Microbacterium* Species to Reveal Diversity, Potential for Secondary Metabolites and Heavy Metal Resistance. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 11, 2020.
- COSTANTINO, V.; FATTORUSSO, E.; MANGONI, A.; PERINU, C.; TETA, R.; PANZA, E.; IANARO, A. Tedarenes A and B: Structural and stereochemical analysis of two new strained cyclic diarylheptanoids from the marine sponge *Tedania ignis*. **Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 77, n. 15, p. 6377–6383, 2012.
- COVINGTON, B. C.; MCLEAN, J. A.; BACHMANN, B. O. Comparative mass spectrometry-based metabolomics strategies for the investigation of microbial

- secondary metabolites. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 34, n. 1, p. 6–24, 2017.
- CRNKOVIC, C. M.; MAY, D. S.; ORJALA, J. The impact of culture conditions on growth and metabolomic profiles of freshwater cyanobacteria. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 30, n. 1, p. 375–384, 2018.
- DAT, T. T. H.; STEINER, G.; CUC, N. T. K.; SMIDT, H.; SIPKEMA, D. Bacteria Cultivated From Sponges and Bacteria Not Yet Cultivated From Sponges—A Review. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 12, n. November, p. 1–18, 2021.
- DE VOOGD, N. J.; ALVAREZ, B.; BOURY-ESNAULT, N.; CARBALLO, J. L.; CÁRDENAS, P.; DÍAZ, M.C.; DOHRMANN, M.; DOWNEY, R.; HAJDU, E.; HOOPER, J. N. A.; KELLY, M.; KLAUTAU, M.; MANCONI, R.; MORROW, C. C. PISERA, A. B.; RÍOS, P.; RÜTZLER, K.; SCHÖNBERG, C.; VACELET, J.; VAN SOEST, R. W. M. (2022). **World Porifera Database**. Disponível em https://www.marinespecies.org/porifera. doi:10.14284/359. Acesso em: 10-04-2022.
- DOBERVA, M.; SANCHEZ-FERANDIN, S.; FERANDIN, Y.; INTERTAGLIA, L.; CROUÉ, J.; SUZUKI, M.; LEBARON, P.; LAMI, R. Genome sequence of the sponge-associated *Ruegeria halocynthiae* strain MOLA R1/13b, a marine *Roseobacter* with two quorum-sensing-based communication systems. **Genome Announcements**, Washington, v. 2, n. 5, p. 4389, 2014.
- DONIA, M. S.; FRICKE, W. F.; PARTENSKY, F.; COX, J.; ELSHAHAWI, S. I.; WHITE, J. R.; PHILLIPPY, A. M.; SCHATZ, M. C.; PIEL, J.; HAYGOOD, M. G.; RAVEL, J.; SCHMIDT, E. W. Complex microbiome underlying secondary and primary metabolism in the tunicate-*Prochloron* symbiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 108, n. 51, p. E1423-E1432, 2011.
- DUNCAN, K. R.; CRÜSEMANN, M.; LECHNER, A.; SARKAR, A.; LI, J.; ZIEMERT, N.; WANG, M.; BANDEIRA, N.; MOORE, B. S.; DORRESTEIN, P. C.; JENSEN, P. R. Molecular networking and pattern-based genome mining improves discovery of biosynthetic gene clusters and their products from *Salinispora* species. **Chemistry and Biology**, Maryland Heights, v. 22, n. 4, p. 460–471, 2015.
- EPSTEIN, S. S. The phenomenon of microbial uncultivability. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 16, n. 5, p. 636–642, 2013.
- FISCH, K. M.; GURGUI, C.; HEYCKE, N.; VAN DER SAR, S. A.; ANDERSON, S. A.; WEBB, V. L.; TAUDIEN, S.; PLATZER, M.; RUBIO, B. K.; ROBINSON, S. J.; CREWS, P.; PIEL, J. Polyketide assembly lines of uncultivated sponge symbionts from structure-based gene targeting. **Nature Chemical Biology**, London, v. 5, n. 7, p. 494–501, 2009.
- FLOROS, D. J.; JENSEN, P. R.; DORRESTEIN, P. C.; KOYAMA, M. A metabolomics guided exploration of marine natural product chemical space. **Metabolomics**, Basel, v. 12, n. 9, 2016.

- FREEMAN, M. F.; VAGSTAD, A. L.; PIEL, J. Polytheonamide biosynthesis showcasing the metabolic potential of sponge-associated uncultivated "Entotheonella" bacteria. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v. 31, p. 8–14, 2016.
- FUSETANI, N. Biofouling and antifouling. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 21, n. 1, p. 94–104, 2004.
- FUSETANI, N. Antifouling marine natural products. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 28, n. 2, p. 400–410, 2011.
- GENTA-JOUVE, G.; CACHET, N.; HOLDERITH, S.; OBERHÄNSLI, F.; TEYSSIÉ, J. L.; JEFFREE, R.; AL MOURABIT, A.; THOMAS, O. P. New insight into marine alkaloid metabolic pathways: Revisiting oroidin biosynthesis. **ChemBioChem**, Weinheim, v. 12, n. 15, p. 2298–2301, 2011.
- GOMES, N. G. M.; DASARI, R.; CHANDRA, S.; KISS, R.; KORNIENKO, A. Marine invertebrate metabolites with anticancer activities: Solutions to the "supply problem". **Marine Drugs**, Basel, v. 14, n. 5, 2016.
- GOWDA, H.; IVANISEVIC, J.; JOHNSON, C. H.; KURCZY, M. E.; BENTON, H. P.; RINEHART, D.; NGUYEN, T.; RAY, J.; KUEHL, J.; AREVALO, B.; WESTENSKOW, P. D.; WANG, J.; ARKIN, A. P.; DEUTSCHBAUER, A. M.; PATTI, G. J.; SIUZDAK, G. Interactive XCMS Online: Simplifying Advanced Metabolomic Data Processing and Subsequent Statistical Analyses. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 86, n. 14, p. 6931–6939, 15 jul. 2014.
- HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, London, v. 14, n. 2, p. 111–129, 2015.
- HENTSCHEL, U.; PIEL, J.; DEGNAN, S. M.; TAYLOR, M. W. Genomic insights into the marine sponge microbiome. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 10, n. 9, p. 641–654, 2012.
- HENTSCHEL, U.; USHER, K. M.; TAYLOR, M. W. Marine sponges as microbial fermenters. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 55, n. 2, p. 167–177, 2006.
- HONG, S. H.; BAN, Y. H.; BYUN, W. S.; KIM, D.; JANG, Y. J.; AN, J. S.; SHIN, B.; LEE, S. K.; SHIN, J.; YOON, Y. J.; OH, D. C. Camporidines A and B: Antimetastatic and Anti-inflammatory Polyketide Alkaloids from a Gut Bacterium of *Camponotus kiusiuensis*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 82, n. 4, p. 903–910, 2019.
- HOU, C. C.; CHEN, Y. P.; WU, J. H.; HUANG, C. C.; WANG, S. Y.; YANG, N. S.; SHYUR, L. F. A galactolipid possesses novel cancer chemopreventive effects by suppressing inflammatory mediators and mouse B16 melanoma. **Cancer Research**, Baltimore, v. 67, n. 14, p. 6907–6915, 2007.

- HOU, X. M.; LI, Y. Y.; SHI, Y. W.; FANG, Y. W.; CHAO, R.; GU, Y. C.; WANG, C. Y.; SHAO, C. L. Integrating Molecular Networking and 1 H NMR To Target the Isolation of Chrysogeamides from a Library of Marine-Derived *Penicillium* Fungi. **Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 84, n. 3, p. 1228–1237, 2019.
- HOU, Y.; BRAUN, D. R.; MICHEL, C. R.; KLASSEN, J. L.; ADNANI, N.; WYCHE, T. P.; BUGNI, T. S. Microbial strain prioritization using metabolomics tools for the discovery of natural products. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 84, n. 10, p. 4277–4283, 2012.
- IGARASHI, M.; SAWA, R.; YAMASAKI, M.; HAYASHI, C.; UMEKITA, M.; HATANO, M.; FUJIWARA, T.; MIZUMOTO, K.; NOMOTO, A. Kribellosides, novel RNA 5'-triphosphatase inhibitors from the rare actinomycete *Kribbella* sp. MI481-42F6. **Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 70, n. 5, p. 582–589, 2017.
- INABA, K.; SATO, H.; TSUDA, M.; KOBAYASHI, J. Spongiacidins A-D, new bromopyrrole alkaloids from *Hymeniacidon* sponge. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 61, n. 5, p. 693–695, 1998.
- INAGAKI, M.; IWAKUMA, R.; KAWAKAMI, S.; OTSUKA, H. RAKOTONDRAIBE, H. L. Detecting and Differentiating Monosaccharide Enantiomers by <sup>1</sup>H NMR Spectroscopy. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 84, n. 7, p. 1863–1869, 2021.
- IÓCA, L. P.; DAI, Y.; KUNAKOM, S.; DIAZ-ESPINOSA, J.; KRUNIC, A.; CRNKOVIC, C. M.; ORJALA, J.; SANCHEZ, L. M.; FERREIRA, A. G.; BERLINCK, R. G. S.; EUSTÁQUIO, A. S. A Family of nonribosomal peptides modulate collective behavior in pseudovibrio bacteria isolated from marine sponges. **Angewandte Chemie International Edition**, Weinheim, v. 60, n. 29, p. 15891–15898, 2021.
- 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**, São Paulo, v. 39, n. 6, p. 720–731, 2016.
- IÓCA, L. P. **Descoberta e estudos de biossíntese de peptídeos não-ribossomais envolvidos na motilidade de** *Pseudovirbrio brasiliensis* **<b>Ab134.** Orientador: Prof. Dr. Roberto G. S. Berlinck. 2020. 212p. Tese (Doutorado) -Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020.
- ISBISTER, G. K.; HOOPER, J. N. A. Clinical effects of stings by sponges of the genus *Tedania* and a review of sponge stings worldwide. **Toxicon**, Oxford, v. 46, n. 7, p. 782–785, 2005.
- KARIMI, E.; GONÇALVES, J. M. S.; REIS, M.; COSTA, R. Draft genome sequence of *microbacterium* sp. strain alg239\_v18, an actinobacterium retrieved from the marine

- sponge *spongia* sp. **Genome Announcements**, Washington, v. 5, n. 3, p. 1–2, 19,. 2017.
- KITAGAWA, I.; KOBAYASHI, M.; KITANAKA, K.; KIDO, M.; KYOGOKU, Y. Marine natural products. XII. on the chemical constituents of the Okinawan marine sponge *Hymeniacidon aldis*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 31, n. 7, p. 2321–2328, 1983.
- KOBAYASHI, J.; ISHIBASHI, M. Bioactive metabolites of symbiotic marine microorganisms. **Chemical Reviews**, Washington, v. 93, n. 5, p. 1753–1769, 1993.
- KOSSUGA, M. H.; ROMMINGER, S.; XAVIER, C.; MILANETTO, M. C.; DO VALLE, M. Z.; PIMENTA, E. F.; MORAIS, R. P.; DE CARVALHO, E.; MIZUNO, C. M.; CORADELLO, L. F. C.; BARROSO, V. M.; VACONDINO, 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**, João Pessoa, v. 22, n. 2, p. 257–267, 2012.
- KRUG, D.; MÜLLER, R. Secondary metabolomics: the impact of mass spectrometry-based approaches on the discovery and characterization of microbial natural products. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 31, n. 6, p. 768–783, 2014.
- KRUG, D.; ZUREK, G.; REVERMANN, O.; VOS, M.; VELICER, G. J.; MÜLLER, R. Discovering the hidden secondary metabolome of *Myxococcus xanthus*: A study of intraspecific diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 10, p. 3058–3068, 2008.
- LACKNER, G.; PETERS, E. E.; HELFRICH, E. J. N.; PIEL, J. Insights into the lifestyle of uncultured bacterial natural product factories associated with marine sponges. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 114, n. 3, p. E347–E356, 2017.
- LEAL, M. C.; SHERIDAN, C.; OSINGA, R.; DIONÍSIO, G.; ROCHA, R. J. M.; SILVA, B.; ROSA, R.; CALADO, R. Marine microorganism-invertebrate assemblages: Perspectives to solve the "supply problem" in the initial steps of drug discovery.

  Marine Drugs, Basel, v. 12, n. 7, p. 3929–3952, 2014.
- LI, J. W. H.; VEDERAS, J. C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? **Science**, Washington, v. 325, n. 5937, p. 161–165, 2009.
- LIANG, X.; LUO, D.; LUESCH, H. Advances in exploring the therapeutic potential of marine natural products. **Pharmacological Research**, London, v. 147, p. 104373, 2019.
- LINDEL, T. Chemistry and biology of the pyrrole–imidazole alkaloids. In: Alkaloids: Chemistry and Biology. Elsevier, Oxford, 2017, v. 77, p. 117–219.

- LINDEL, T.; HOFFMANN, H.; HOCHGÜRTEL, M.; PAWLIK, J R. Structure-activity relationship of inhibition of fish feeding by sponge- derived and synthetic pyrrole-imidazole alkaloids. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 26, n. 6, p. 1477–1496, 2000.
- LINDEQUIST, U. Marine-derived pharmaceuticals challenges and opportunities. **Biomolecules and Therapeutics**, Seoul, v. 24, n. 6, p. 561–571, 2016.
- LIU, D.; LIN, H.; PROKSCH, P.; TANG, X.; SHAO, Z.; LIN, W. Microbacterins A and B, new peptaibols from the deep sea actinomycete *Microbacterium sediminis* sp. nov. YLB-01(T). **Organic Letters**, Washington, v. 17, n. 5, p. 1220–1223, 2015.
- LOVELL, F. M. The Structure of a bromine-rich marine antibiotic. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 88, n. 19, p. 4510–4511, 1966.
- LOYA, S.; RESHERF, V.; MIZRACHI, E.; SILBERSTEIN, C.; RACHAMIM, Y.; CARMELI, S.; HIZI, A. The inhibition of the reverse transcriptase of HIV-1 by the natural sulfoglycolipids from cyanobacteria: Contribution of different moieties to their high potency. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 61, n. 7, p. 891–895, 1998.
- MACHADO, H.; SONNENSCHEIN, E. C.; MELCHIORSEN, J.; GRAM, L. Genome mining reveals unlocked bioactive potential of marine Gram-negative bacteria. **BMC Genomics**, London, v. 16, n. 1, p. 1–12, 2015.
- MANDAKOVIC, D.; CINTOLESI, A.; MALDONADO, J.; MENDOZA, S. N.; AÏTE, M.; GAETE, A.; SAITUA, F.; ALLENDE, M.; CAMBIAZO, V.; SIEGEL, A.; MAASS, A.; GONZÁLEZ, M.; LATORRE, M. Genome-scale metabolic models of *microbacterium* species isolated from a high altitude desert environment. **Scientific Reports**, London, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2020.
- MANSSON, M.; GRAM, L.; LARSEN, T. O. Production of bioactive secondary metabolites by marine *Vibrionaceae*. **Marine Drugs**, Basel, v. 9, n. 9, p. 1440–1468, 2011.
- MARRIS, E. Drugs from the deep. Nature, London, v. 443, n. 7114, p. 904–905.
- MASSCHELEIN, J.; JENNER, M.; CHALLIS, G. L. Antibiotics from gram-negative bacteria: a comprehensive overview and selected biosynthetic highlights. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 34, n. 7, p. 712–783, 2017.
- 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**, Tokyo, v. 73, n. 8, p. 504–525, 2020.
- MEDEMA, M. H.; FISCHBACH, M. A. Computational approaches to natural product discovery. **Nature Chemical Biology**, London, v. 11, n. 9, p. 639–648, 2015.

- MEHBUB, M. F.; LEI, J.; FRANCO, C.; ZHANG, W. Marine sponge derived natural products between 2001 and 2010: Trends and opportunities for discovery of bioactives. **Marine Drugs**, Basel, v. 12, n. 8, p. 4539–4577, 2014.
- MELANDER, C.; MOELLER, P. D. R.; BALLARD, E.; RICHARDS, J. J.; HUIGENS, R. W.; CAVANAGH, J. Evaluation of dihydrooroidin as an antifouling additive in marine paint. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Essex, v. 63, n. 4, p. 529–532, 2009.
- MITOVA, M.; POPOV, S.; DE ROSA, S. Cyclic peptides from a *ruegeria* strain of bacteria associated with the sponge *Suberites domuncula*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 67, n. 7, p. 1178–1181, 2004.
- MOHAMED, N. M.; CICIRELLI, E. M.; KAN, J. J.; CHEN, F.; FUQUA, C.; HILL, R. T. Diversity and quorum-sensing signal production of Proteobacteria associated with marine sponges. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 10, n. 1, p. 75–86, 2008.
- MOHANTY, I.; MOORE, S. G.; YI, D.; BIGGS, J. S.; GAUL. D. A.; GARG, N.; AGARWAL, V. Precursor-guided mining of marine sponge metabolomes lends insight into biosynthesis of pyrrole–imidazole alkaloids. **ACS Chemical Biology**, Washington, v. 15, n. 8, p. 2185–2194, 2020.
- MOHANTY, I.; TAPADAR, S.; MOORE, S. G.; BIGGS, J. S.; FREEMAN, C. J.;, GAUL, D. A.; GARG, N.; AGARWAL, V. Presence of bromotyrosine alkaloids in marine sponges is independent of metabolomic and microbiome architectures. **mSystems**, Washington, v. 6, n. 2, p. e01387-20, 2021.
- MORIMOTO, T.; NAGATU, A.; MURAKAMI, N.; SAKAKIBARA, J.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; IWASHIMA, A. Anti-tumour-promoting glyceroglycolipids from the green alga, *Chlorella vulgaris*. **Phytochemistry**, London, v. 40, n. 5, p. 1433–1437, 1995.
- MOTHES, B.; HAJDU, E.; VAN SOEST, R. W. M. *Tedania brasiliensis* new species (demospongiae, poecilosclerida, tedaniidae) from Brazil, with some remarks about the genus *tedania* in the tropical southwestern atlantic. **Bulletin of Marine Science**, Miami, v. 66, n. 1, p. 1–11, 2000.
- NEWMAN, D. J. Developing natural product drugs: supply problems and how they have been overcome. **Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 162, p. 1–9, 2016.
- 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**, Washington, 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.; EUSTÁQUIO, 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**, Washington, v. 80, n. 2, p. 235–240, 2017.
- OKUKADO, N. The Structure of tedanin, a new carotenoid of *Tedania digitata* (o. schmidt). **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, Tokyo, v. 48, n. 3, p. 1061–1062, 1975.
- PAKKIRI, L. S.; WOLUCKA, B. A.; LUBERT, E. J.; WAECHTER, C. J. Structural and topological studies on the lipid-mediated assembly of a membrane-associated lipomannan in *Micrococcus luteus*. **Glycobiology**, Basel, v. 14, n. 1, p. 73–81, 2004.
- PARAMESWARAN, P. S.; NAIK, C. G.; HEGDE, V. R. Secondary metabolites from the sponge *Tedania anhelans*: isolation and characterization of two novel pyrazole acids and other metabolites. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 60, n. 8, p. 802–803, 1997.
- PARRA, L. L. L.; BERTONHA, A. F.; SEVERO, I. R. M.; AGUIAR, A. C. C.; DE SOUZA, G. E.; OLIVA, G.; GUIDO, R. V. C.; GRAZZIA, N.; COSTA, T. R.; MIGUEL, D. C.; GADELHA, F. R.; FERREIRA, A G.; HAJDU, E.; ROMO, D.; BERLINCK, R. G. S. Isolation, derivative synthesis, and structure-activity relationships of antiparasitic bromopyrrole alkaloids from the marine sponge *Tedania brasiliensis*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 81, n. 1, p. 188–202, 2018.
- PAŚCIAK, M.; HOLST, O.; LINDNER, B.; MIERZCHALA, M.; GRZEGORZEWICZ, A.; MORDARSKA, H.; GAMIAN, A. Structural and serological characterization of the major glycolipid from *Rothia mucilaginosa*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1675, n. 1–3, p. 54–61, 2004.
- 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**, Berlin, v. 195, n. 2, p. 99–111, 2013.
- PATTI, G. J.; YANES, O.; SIUZDAK, G. Innovation: metabolomics: the apogee of the omics trilogy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 13, n. 4, p. 263–269, 2012.
- PETTIT, G. R.; XU, J. P.; CHAPUIS, J. C.; PETTIT, R. K.; TACKETT, L. P.; DOUBEK, D. L.; HOOPER, J. N. A.; SCHMIDT, J. M. Antineoplastic agents. part 520. isolation and structure of irciniastatins a and b from the indo-pacific marine sponge *Ircinia ramosa*. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 47, p. 1149–1152, 2004.
- PIEL, J. A polyketide synthase-peptide synthetase gene cluster from an uncultured bacterial symbiont of *Paederus* beetles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, n. 22, p. 14002–14007, 2002.
- PIEL, J. Bacterial symbionts: prospects for the sustainable production of invertebrate-derived pharmaceuticals. **Current Medicinal Chemistry**, Sharjah, v. 13, n. 1, p. 39-50, 2006.

- PIEL, J.; HUI, D.; WEN, G.; BUTZKE, D.; PLATZER, M.; FUSETANI, N.; MATSUNAGA, S. Antitumor polyketide biosynthesis by an uncultivated bacterial symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, n. 46, p. 16222–16227, 2004.
- PIEL, J.; WEN, G.; PLATZER, M.; HUI, D. Unprecedented diversity of catalytic domains in the first four modules of the putative pederin polyketide synthase. **Chembiochem**, Weinheim, v. 5, n. 1, p. 93–98, 2004.
- PITA, L.; RIX, L.; SLABY, B. M.; FRANKE, A.; HENTSCHEL, U. The sponge holobiont in a changing ocean: from microbes to ecosystems. **Microbiome**, London, v. 6, n. 1, p. 46, 2018.
- QUINN, R. J.; GREGSON, R. P.; COOK, A. F.; BARTLETT, R. T. Isolation and synthesis of 1-methylisoguanosine, a potent pharmacologically active constituent from the marine sponge *Tedania digitata*. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v. 21, n. 6, p. 567–568, 1980.
- QUINN, R. A.; NOTHIAS, L. F.; VINING, O.; MEEHAN, M.; ESQUENAZI, E.; DORRESTEIN, P. C. Molecular networking as a drug discovery, drug metabolism, and precision medicine strategy. **Trends in Pharmacological Sciences**, Amsterdam, v. 38, n. 2, p. 143–154, 2017.
- RADJASA, O. K.; VASKE, Y. M.; NAVARRO, G.; VERVOORT, H. C.; TENNEY, K.; LININGTON, R. G.; CREWS, P. Highlights of marine invertebrate-derived biosynthetic products: Their biomedical potential and possible production by microbial associants. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 19, n. 22, p. 6658–6674, 2011.
- RAMM, W.; SCHATTON, W.; WAGNER-DÖBLER, I.; WRAY, V.; NIMTZ, M.; TOKUDA, H.; ENJYO, F.; NISHINO, H.; BEIL, W.; HECKMANN, R.; LURTZ, V.; LANG, S. Diglucosyl-glycerolipids from the marine sponge-associated *Bacillus pumilus* strain AAS3: Their production, enzymatic modification and properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 64, n. 4, p. 497–504, 2004.
- RANDALL, J. E.; HARTMAN, W. D. Sponge-feeding fishes of the West Indies. **Marine Biology**, Berlin, v. 1, n. 3, p. 216–225, 1968.
- RASHID, S.; CHARLES, T. C.; GLICK, B. R. Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 61, p. 217–224, 2012.
- RATEB, M. E.; HOUSSEN, W. E.; HARRISON, W. T. A.; DENG, H.; OKORO, C. K.; ASENJO, J. A.; ANDREWS, B. A.; BULL, A. T.; GOODFELLOW, M.; EBEL, R.; JASPARS, M. Diverse metabolic profiles of a *Streptomyces* strain isolated from a hyper-arid environment. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 74, n. 9, p. 1965–1971, 2011.

- REIS-MANSUR, M. C. P. P.; CARDOSO-RURR, J. S.; ABREU-SILVA, J. V. M.; RODRIGUES DE SOUZA, G.; CARDOSO, V. S.; PASSOS-MANSOLDO, F. R.; PINHEIRO, Y.; SCHULTZ, J.; LOPEZ-BALORRIN, L. B.; RIBEIRO DA SILVA, A. J.; LAGE, C.; PEREIRA DOS SANTOS, E.; SOARES-ROSADO, A.; VERMELHO, A. B. Carotenoids from uv-resistant antarctic *Microbacterium* sp. LEMMJ01. **Scientific Reports**, London, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2019.
- RICHARDS, J. J.; BALLARD, E.; HUIGENS, R. W.; MELANDER, C. Synthesis and screening of an oroidin library against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **ChemBioChem**, Weinheim, v. 9, n. 8, p. 1267–1279, 2008.
- RIVERS, A. R.; BURNS, A. S.; CHAN, L. K.; MORAN, M. A. Experimental identification of small non-coding RNAs in the model marine bacterium *Ruegeria pomeroyi* DSS-3. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 7, n. MAR, 2016.
- ROBERTS, L. D.; SOUZA, A. L.; GERSZTEN, R. E.; CLISH, C. B. Targeted metabolomics. **Current Protocols in Molecular Biology**, New York, v. 1, n. SUPPL.98, p. 1–24, 2012.
- RODRÍGUEZ, J. P. G.; BERNARDI, D. I.; GUBIANI, J. R.; MAGALHÃES DE OLIVERIVA, J.; MORAIS-URANO, R. P.; BERTONHA, A. F.; BANDEIRA, K. F.; BULLA, J. I Q.; SETTE, L. D.; FERREIRA, A. G.; BATISTA JR., J. M.; DE SOUZA SILVA, T.; ALVES DOS SANTOS, R.; MARTINS, C. H. G.; LIRA, S. P.; DA CUNHA, M. G.; TRIVELLA, D. B. B.; GRAZZIA, N.; GOMES, N. E. S.; GADELHA, F.; MIGUEL, D. C.; CAUZ, A. C. G.; BROCCHI, M.; BERLINCK, R. G. S. Water-soluble glutamic acid derivatives produced in culture by *Penicillium solitum* is1-a from king george island, maritime antarctica. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 83, n. 1, p. 55–65, 2020.
- ROMANO, G.; COSTANTINI, M.; SANSONE, C.; LAURITANO, C.; RUOCCO, N.; IANORA, A. Marine microorganisms as a promising and sustainable source of bioactive molecules. **Marine Environmental Research**, London, v. 128, p. 58–69, 2017.
- 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**, Corte Madera, v. 2014, n. 1, p. 1–14, 2014.
- RUA, C. P. J.; DE 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**, New York, v. 76, n. 3, p. 825–838, 2018.

- RUST, M.; HELFRICH, E. J. N.; FREEMAN, M. F.; NANUDORN, P.; FIELD, C. M.; RÜCKERT, C.; KÜNDIG, T.; PAGE, M. J.; WEBB, V. L.; KALINOWSKI, J.; SUNAGAWA, S.; PIEL, J. A multiproducer microbiome generates chemical diversity in the marine sponge *Mycale hentscheli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 117, n. 17, p. 9508–9518, 2020.
- RUTLEDGE, P. J.; CHALLIS, G. L. Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 13, n. 8, p. 509–523, 2015.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular biology and evolution**, New York, v. 4, n. 4, p. 406–425, 1987.
- SAKEMI, S.; ICHIBA, T.; KOHMOTO, S.; SAUCY, G. Isolation and structure elucidation of onnamide A, a new bioactive metabolite of a marine sponge, *Theonella* sp. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 110, n. 14, p. 4851–4853, 1988.
- SASSAKI, G. L.; MACHADO, M. J.; TISCHER, C. A.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Glycosyldiacylglycerolipids from the Lichen *Dictyonema glabratum*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 62, n. 6, p. 844–847, 1999.
- SCALA, F.; FATTORUSSO, E.; MENNA, M.; TAGLIATELA-SCAFATI, O.; TIERNEY, M.; KAISER, M.; TASDEMIR, D. Bromopyrrole alkaloids as lead compounds against protozoan parasites. **Marine Drugs**, Basel, v. 8, n. 7, p. 2162–2174, 2010.
- SCHMITZ, F. J.; VANDERAH, D. J.; HOLLENBEAK, K. H.; ENWALL, C. E. L.; GOPICHAND, Y. Metabolites from the marine sponge *Tedania ignis*. a new atisanediol and several known diketopiperazines. **Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 48, n. 22, p. 3941–3945, 1983.
- SCHMITZ, F. J.; GUNASEKERA, S. P.; YALAMANCHILI, G.; HOSSAIN, M. B.; VAN DER HELM, D. Tedanolide: a potent cytotoxic macrolide from the caribbean sponge *Tedania ignis*. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 106, n. 23, p. 7251–7252, 1984.
- SEEMANN, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics**, Oxford, v. 30, n. 14, p. 2068–2069, 2014.
- SEIPP, K.; GESKE, L.; OPATZ, T. Marine pyrrole alkaloids. **Marine Drugs**, Basel, v. 19, n. 9, p. 514-593.
- SELDES, A. M.; GROS, E. G.; ROVIROSA, J.; VASQUEZ, M. L.; SAN-MARTIN, A. Sterols from the marine sponge *Tedania excavata*. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 16, n. 5, p. 495–496, 1988.

- SHINDE, P.; BANERJEE, P.; MANDHARE, A. Marine natural products as source of new drugs: a patent review (2015–2018). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, London, v. 29, n. 4, p. 283–309, 2019.
- SHIRAHASHI, H.; MURAKAMI, N.; WATANABE, M.; NAGATSU, A.; SAKAKIBARA, J.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; IWASHIMA, A. Studies on glycolipids. part viii. isolation and identification of anti-tumor-promoting principles from the fresh-water cyanobacterium *Phormidium tenue*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 41, n. 9, p. 1664–1666, 1993.
- SHIVAJI, S.; BHADRA, B.; RAO, R. S.; CHATURVEDI, P.; PINDI, P. K.; RAGHUKUMAR, C. *Microbacterium indicum* sp. nov., isolated from a deep-sea sediment sample from the chagos trench, indian ocean. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 57, n. 8, p. 1819–1822, 2007.
- SIGWART, J. D.; BLASIAK, R.; JASPARS, M.; JOUFFRAY, J. B.; TASDEMIR, D. Unlocking the potential of marine biodiscovery. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 38, n. 7, p. 1235–1242, 2021.
- SILVA, F. R; TESSIS, A. C.; FERREIRA, P. F.; RANGEL, L. P.; GARCIA-GOMES, A. S.; PEREIRA, F. R.; BERLINCK, R. G. S.; MURICY, G.; FERREIRA-PEREIRA, A. Oroidin Inhibits the Activity of the Multidrug Resistance Target Pdr5p from Yeast Plasma Membranes. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 74, p. 279–282, 2011.
- SINGH, K. S.; MAJIK, M. S. Pyrrole-Derived Alkaloids of Marine Sponges and Their Biological Properties. Em: **Studies in Natural Products Chemistry**. New York, 1. ed. Elsevier, 2019. v. 62, p. 377–409, 2019.
- SONNENSCHEIN, E. C.; NIELSEN, K. F.; D'ALVISE, P.; PORSBY, C. H.; MELCHIORSEN, J.; HEILMANN, J.; KALATZIS, P. G.; LÓPEZ-PÉREZ, M.; BUNK, B.; SPRÖER, C.; MIDDELBOE, M.; GRAM, L.. Global occurrence and heterogeneity of the *Roseobacter*-clade species *Ruegeria mobilis*. **ISME Journal**, London, v. 11, n. 2, p. 569–583, 2017.
- SPARKS, T. C.; DUKE, S. O. Structure Simplification of Natural Products as a Lead Generation Approach in Agrochemical Discovery. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 69, n. 30, p. 8324–8346, 4 ago. 2021.
- STOREY, M. A.; ANDREASSEND, S. K.; BRACEGIRDLE, J.; BROWN, A.; KEYZERS, R. A.; ACKERLEY, D. F.; NORTHCOTE, P. T.; OWEN, J. G. Metagenomic exploration of the marine sponge *Mycale hentscheli* uncovers multiple polyketide-producing bacterial symbionts. **mBio**, Washington, v. 11, n. 2, 2020.
- STOUT, E. P.; MORINAKA, B. I.; WANG, Y. G.; ROMO, D.; MOLINSKI, T. F. De Novo Synthesis of Benzosceptrin C and Nagelamide H from 7- <sup>15</sup> N-Oroidin: Implications for Pyrrole–Aminoimidazole Alkaloid Biosynthesis. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 75, n. 4, p. 527–530, 2012.

- STOUT, E. P.; WANG, Y. G.; ROMO, D.; MOLINSKI, T. F. Pyrrole aminoimidazole alkaloid metabiosynthesis with marine sponges *Agelas conifera* and *Stylissa caribica*. **Angewandte Chemie International Edition**, Weinheim, v. 51, n. 20, p. 4877–4881, 2012.
- TABARES, P.; PIMENTEL-ELARDO, S. H.; SCHIRMEISTER, T.; HÜNIG, T.; HENTSCHEL, U. Anti-protease and Immunomodulatory Activities of Bacteria Associated with Caribbean Sponges. **Marine Biotechnology**, New York, v. 13, n. 5, p. 883–892, 2011.
- TAKEUCHI, M.; HATANO, K. Union of the genera *Microbacterium* Orla-Jensen and *Aureobacterium* Collins *et al.* in a redefined genum *Microbacterium*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 48, n. 1 998, p. 739–747, 1998.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, New York, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, 2013.
- TAREQ, F. S.; LEE, H. S.; LEE, Y. J.; LEE, J. S.; SHIN, H. J. leodoglucomide C and ieodoglycolipid, new glycolipids from a marine-derived bacterium *Bacillus licheniformis* 09IDYM23. **Lipids**, Weinheim, v. 50, n. 5, p. 513–519, 2015.
- TASDEMIR, D.; TOPALOGLU, B.; PEROZZO, R.; BRUN, R.; O'NEILL, R.; CARBALLEIRA, N. M.; ZHANG, X.; TONGE, P. J.; LINDEN, A.; RÜEDI, P. Marine natural products from the Turkish sponge *Agelas oroides* that inhibit the enoyl reductases from *Plasmodium falciparum*, *Mycobacterium tuberculosis* and *Escherichia coli*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 15, n. 21, p. 6834–6845, 2007.
- TAUTENHAHN, R.; PATTI, G. J.; RINEHART, D.; SIUZDAK, G. XCMS online: A web-based platform to process untargeted metabolomic data. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 84, n. 11, p. 5035–5039, 2012.
- TAYLOR, M. W.; RADAX, R.; STEGER, D.; WAGNER, M. Sponge-Associated Microorganisms: Evolution, Ecology, and Biotechnological Potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 71, n. 2, p. 295–347, 2007.
- THISSERA, B.; SAYED, A. M.; HASSAN, H. M.; ABDELMOHSEN, U. R.; EBEL, R.; JASPARS, M.; RATEB, M. R. **The Hidden Treasure: Marine Microbiome as Repository of Bioactive Compounds. In: The Marine Microbiome**. p. 693–729.
- THOMPSON, F. L.; IIDA, T.; SWINGS, J. Biodiversity of vibrios. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 68, n. 3, p. 403–431, 2004.
- 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**, Oxford, v. 8, n. 5, p. 1–10, 2019.

- TRINDADE-SILVA, A. E.; RUA, C. P. J.; ANDRADE, B. G. N.; PAULO VICENTE, A. C.; 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**, Washington, v. 79, n. 5, p. 1598–1605, 2013.
- TRINDADE-SILVA, A. E.; RUA, C.; 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**, San Francisco, v. 7, n. 7, p. 1–10, 2012.
- TSUKAMOTO, S.; KATO, H.; HIROTA, H.; FUSETANI, N. Mauritiamine, a new antifouling oroidin dimer from the marine sponge *Agelas mauritiana*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 59, n. 5, p. 501–503, 1996a.
- TSUKAMOTO, S.; KATO, H.; HIROTA, H.; FUSETANI, N. Ceratinamides A and B: new antifouling dibromotyrosine derivatives from the marine sponge *Pseudoceratina purpurea*. **Tetrahedron**, Oxford, v. 52, n. 24, p. 8181–8186, 1996b.
- UCHINO, Y.; HIRATA, A.; YOKOTA, A.; SUGIYAMA, J. Reclassification of marine **agrobacterium** species: proposals of *Stappia stellulata* gen. nov., comb. nov., *Stappia aggregata* sp. nov., nom. rev., *Ruegeria atlantica* gen. nov., comb. nov., *Ruegeria gelatinovora* comb, nov., *Ruegeria Agicola* comb. nov., and *Ahrensia kieliense* gen. nov., sp. nov., nom. rev. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 44, n. 3, p. 201–210, 1998.
- UDWARY, D. W.; ZEIGLER, L.; ASOLKAR, R. N.; SINGAN, V.; LAPIDUS, A.; FENICAL, W. JENSEN, P. R.; MOORE, B. S. Genome sequencing reveals complex secondary metabolome in the marine actinomycete *Salinispora tropica*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 104, n. 25, p. 10376–10381, 2007.
- UM, S.; GUO, H.; THIENGMAG, S.; BENNDORF, R.; MURPHY, R.; RISCHER, M.; BRAGA, D.; POULSEN, M.; DE BEER, Z. W., LACKNER, G.; BEEMELMANNS, C. Comparative genomic and metabolic analysis of *Streptomyces* sp. rb110 morphotypes illuminates genomic rearrangements and formation of a new 46-membered antimicrobial macrolide. **ACS Chemical Biology**, Washington, v. 16, n. 8, p. 1482–1492, 2021.
- VAN DER HOOFT, J. J.; MOHIMANI, H.; BAUERMEISTER, A.; DORRESTEIN, P. C.; DUNCAN, K. C.; MEDEMA, M. H. Linking genomics and metabolomics to chart specialized metabolic diversity. **Chemical Society Reviews**, Cambridge, v. 49, n. 11, p. 3297–3314, 2020.
- VAN SANTEN, J. A.; JACOB, G.; SINGH, A. L.; ANIEBOK, V.; BALUNAS, M. J.; BUNSKO, D.; CARNEVALE NETO, F.; CASTAÑO-ESPRIU, L.; CHANG, C.; CLARK, T. N.; CLEARY LITTLE, J. L.; DELGADILLO, D. A.; DORRESTEIN, P. C.; DUNCAN, K. R.; EGAN, J. M.; GALEY, M. M.; HAECKL, F. P. J.; HUA, A.; HUGHES, A. H.;

- ISKAKOVA, D.; KHADILKAR, A.; LEE, J. H.; LEE, S.; LEGROW, N.; LIU, D. Y.; MACHO, J. M.; MCCAUGHEY, C. S.; MEDEMA, M. H.; NEUPANE, R. P.; O'DONNELL, T. J.; PAULA, J. S.; SANCHEZ, L.M.; SHAIKH, A. F.; SOLDATOU, S.; TERLOUW, B. R.; TRAN, T. A.; VALENTINE, M.; VAN DER HOOFT, J. J. J.; VO, D. A.; WANG, M.; WILSON, D; ZINK, K. E.; LININGTON, R. G. The natural products atlas: an open access knowledge base for microbial natural products discovery. **ACS Central Science**, Washington, v. 5, n. 11, p. 1824–1833, 2019.
- VAN SOEST, R. W. M.; BOURY-ESNAULT, N.; VACELET, J.; DOHRMANN, M.; ERPENBECK, D.; DE VOOGD, N. J.; SANTODOMINGO, N.; VANHOORNE, B.; KELLY, M.; HOOPER, J. N. A. Global diversity of sponges (Porifera). **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 4, 2012.
- WALSH, C. T.; FISCHBACH, M. A. Natural products version 2.0: Connecting genes to molecules. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 132, n. 8, p. 2469–2493, 2010.
- WANG, M. et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**, New York, v. 34, n. 8, p. 828–837, 2016.
- WANG, X.; MA, Z.; WANG, X.; DE, S.; MA, Y.; CHEN, C. Dimeric pyrrole–imidazole alkaloids: Synthetic approaches and biosynthetic hypotheses. **Chemical Communications**, Cambridge, v. 50, n. 63, p. 8628–8639, 2014.
- WANG, Y. G.; MORINAKA, B. I.; REYES, J. C. P.; WOLFF, J. J.; ROMO, D.; MOLINSKI, T. F. Synthesis of 7-15N-oroidin and evaluation of utility for biosynthetic studies of pyrrole-imidazole alkaloids by microscale 1H-15N HSQC and FTMS. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 73, n. 3, p. 428–434, 2010.
- WATERS, A. L.; PERAUD, O.; KASANAH, 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**, Lausanne, v. 1, n. OCT, p. 1–15, 2014.
- WEBSTER, N. S.; THOMAS, T. The sponge hologenome. **mBio**, Washington, v. 7, n. 2, p. 1–14, 2016.
- WICKE, C.; HÜNTERS, M.; WRAY, V.; NIMTZ, M.; BILITEWSKI, U.; LANG, S. Production and structure elucidation of glycoglycerolipids from a marine sponge-associated *Microbacterium* species. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 63, n. 5, p. 621–626, 2000.
- WILSON, D. M.; PUYANA, M.; FENICAL, W.; PAWLIK, J. R. Chemical defense of the Caribbean reef sponge *Axinella corrugata* against predatory fishes. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 25, n. 12, p. 2811–2823, 1999.

- WILSON, M. C.; MORI, T.; RÜCKERT, C.; URIA, A. R.; HELF, M. J.; TAKADA, K.; GERNERT, C.; STEFFENS, U. A. E.; HEYCKE, N.; SCHMITT, S.; RINKE, C.; HELFRICH, E. J. N.; BRACHMANN, A. O.; GURGUI, C.; WAKIMOTO, T.; KRACHT, M.; CRÜSEMANN, M.; HENTSCHEL, U.; ABE, I.; MATSUNAGA, S.; KALINOWSKI, J.; TAKEYAMA, H.; PIEL, J. An environmental bacterial taxon with a large and distinct metabolic repertoire. **Nature**, London, v. 506, n. 7486, p. 58–62, 2014.
- WIRTH, J. S.; WHITMAN, W. B. Phylogenomic analyses of a clade within the roseobacter group suggest taxonomic reassignments of species of the genera *Aestuariivita*, *Citreicella*, *Loktanella*, *Nautella*, *Pelagibaca*, *Ruegeria*, *Thalassobius*, *Thiobacimonas* and *Tropicibacter*, and the proposal of six novel genera.

  International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Reading, v. 68, n. 7, p. 2393–2411, 2018.
- WRATTEN, S. J.; WOLFE, M. S.; ANDERSEN, R. J.; FAULKNER, D. J. Antibiotic metabolites from a marine pseudomonad. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 11, n. 3, p. 411–414, 1977.
- XU, Y.T.; LUO, Y. C.; XUE, J. H.; LI, Y. P.; DONG, L.; LI, W. J.; ZHOU, Z. Y.; WEI, X. Y. Micropyrones A and B, two new α-pyrones from the actinomycete *Microbacterium* sp. GJ312 isolated from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. **Natural Product Research**, Milton Park, p. 1–6, 2021. DOI: 10.1080/14786419.2021.1979546.
- YAGI, H.; MARUYAMA, A. A novel monoacyldiglycosyl-monoacylglycerol from *Flavobacterium marinotypicum*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 62, n. 4, p. 631–632, 1999.
- YAMADA, A.; KITAMURA, H.; YAMAGUCHI, K.; FUKUZAWA, S.; KAMIJIMA, C.; YAZAWA, K.; KURAMOTO, M.; WANG, G. Y. S.; FUJITANI, Y.; UEMURA, D. Development of chemical substances regulating biofilm formation. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, Tokyo, v. 70, n. 12, p. 3061–3069, dez. 1997.
- YANES, O.; TAUTENHAHN, R.; PATTI, G. J.; SIUZDAK, G. Expanding coverage of the metabolome for global metabolite profiling. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 83, n. 6, p. 2152–2161, 2011.
- ZAN, J.; FRICKE, F.; FUQUA, C.; RAVEL, J. HILL, R. T. Genome sequence of *ruegeria* sp. strain klh11, an n-acylhomoserine lactone-producing bacterium isolated from the marine sponge *Mycale laxissima*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 193, n. 18, p. 5011–5012, 2011.
- ZHANG, H.; SAURAV, K.; YU, Z.; MÁNDI, A.; KURTÁN, T.; LI, J.; TIAN, X.; ZHANG, Q.; ZHANG, W.; ZHANG, C. α-Pyrones with Diverse Hydroxy Substitutions from Three Marine-Derived *Nocardiopsis* Strains. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 79, n. 6, p. 1610–1618, 2016a.
- ZHANG, Y.; ADNANI, N.; BRAUN, D. R.; ELLIS, G. A.; BARNS, K. J.; PARKER-NANCE, S.; GUZEI, I. A.; BUGNI, T. S. Micromonohalimanes A and B: Antibacterial

Halimane-Type Diterpenoids from a Marine *Micromonospora* Species. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 79, n. 11, p. 2968–2972, 2016b.

ZHANG, S.; XIE, Q.; SUN, C.; TIAN, X. P.; GUI, C.; QIN, X.; ZHANG, H.; JU, J. Cytotoxic Kendomycins Containing the Carbacylic Ansa Scaffold from the Marine-Derived *Verrucosispora* sp. SCSIO 07399. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 82, n. 12, p. 3366–3371, 2019.

ZHU, X. M.; HACKL, S.; THAKER, M. N.; KALAN, L.; WEBER, C.; URGAST, D. S.; KRUPP, E. M.; BREWER, A.; VANEER, 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**, Weinheim, v. 16, n. 17, p. 2498–2506, 2015.

ZIEMERT, N.; LECHNER, A.; WIETZ, M; MILLÁN-AGUINAGA, N; CHAVARRIA, K. L.; JENSEN, P. R. Diversity and evolution of secondary metabolism in the marine actinomycete genus *Salinispora*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 111, n. 12, p. E1130–E1139, 2014.

ZUMBERGE, J. A.; LOVE, G. D.; CÁRDENAS, P.; SPERLING, E. A.; GUNASEKERA, S.; ROHRSSEN, M.; GROSJEAN, E.; GROTZINGER, J. P.; SUMMONS, R. E. Demosponge steroid biomarker 26-methylstigmastane provides evidence for Neoproterozoic animals. **Nature Ecology and Evolution**, London, v. 2, n. 11, p. 1709–1714, 2018.

## 8. APÊNDICE

### Lista de tabelas

Tabela S1 — Dados de RMN dos compostos J55\_C9 e J55\_C10 (MeOH  $d_4$ ; 145  $^1$ H 600 MHz,  $^{13}$ C 150 MHz).

Tabela S2 — Dados de RMN dos compostos derivados peracetilados 146 J55\_C9PA e J55\_C10PA (MeOH  $d_4$ ; <sup>1</sup>H 600 MHz, <sup>13</sup>C 150 MHz).

# Lista de figuras

Figura S1 — Espectro de <sup>1</sup> H do composto J55_C8 (MeOH $d_4$ ; <sup>1</sup> H 600 MHz).	147
Figura S2 — Espectro de $^{13}$ C do composto J55_C8 (MeOH $d_4$ ; $^{13}$ C 150 MHz).	148
Figura S3 — Espectro DEPT-135 do composto J55_C8 (MeOH $d_4$ ; <sup>13</sup> C 150 MHz).	149
Figura S4 — Espectro COSY do composto J55_C8 (MeOH $d_4$ ; <sup>1</sup> H 600 MHz).	150
Figura S5 — Espectro HSQC do composto J55_C8 (MeOH <i>d</i> <sub>4</sub> ; <sup>1</sup> H 600 MHz).	151
Figura S6 — Espectro HMBC do composto J55_C8 (MeOH $d_4$ ; <sup>1</sup> H 600 MHz).	152
Figura S7 — Espectro de <sup>1</sup> H do composto J55_C8PA (CDCl <sub>3</sub> ; <sup>1</sup> H 600 MHz).	153
Figura S8 — Espectro de <sup>13</sup> C do composto J55_C8PA (CDCl <sub>3</sub> ; <sup>13</sup> C 150 MHz).	154
Figura S9 — Espectro DEPT-135 do composto J55_C8PA (CDCl <sub>3</sub> ; <sup>13</sup> C 150 MHz).	155
Figura S10 — Espectro COSY do composto J55_C8PA (CDCl <sub>3</sub> ; <sup>1</sup> H 600 MHz).	156
Figura S11 — Espectro HSQC do composto J55_C8PA (CDCl <sub>3</sub> ; <sup>1</sup> H 600 MHz).	157
Figura S12 — Espectro HMBC do composto J55_C8PA (CDCl <sub>3</sub> ; <sup>1</sup> H 600 MHz).	158
Figura S13 — Espectro de <sup>1</sup> H do composto J55_C9 (MeOH <i>d</i> <sub>4</sub> ; <sup>1</sup> H 600 MHz).	159
Figura S14 — Espectro de $^{13}$ C do composto J55_C9 (MeOH $d_4$ ; $^{13}$ C 150 MHz).	160
Figura S15 — Espectro COSY do composto J55_C9 (MeOH $d_4$ ; <sup>1</sup> H 600 MHz).	161
Figura S16 — Espectro HSQC do composto J55_C9 (MeOH $d_4$ ; <sup>1</sup> H 600 MHz).	162
Figura S17 — Espectro HMBC do composto J55_C9 (MeOH $d_4$ ; <sup>1</sup> H 600 MHz).	163
Figura S18 — Espectro de <sup>1</sup> H do composto J55_C9PA (CDCl <sub>3</sub> ; <sup>1</sup> H 600 MHz).	164
Figura S19 — Espectro de <sup>13</sup> C do composto J55_C9PA (CDCl <sub>3</sub> ; <sup>13</sup> C 150 MHz).	165
Figura S20 — Espectro de DEPT-135 do composto J55_C9PA (CDCl <sub>3</sub> ; <sup>13</sup> C	166
150 MHz). Figura S21 — Espectro COSY do composto J55_C9PA (CDCl <sub>3</sub> ; <sup>1</sup> H 600	167
MHz). Figura S22 — Espectro HSQC do composto J55_C9PA (CDCl <sub>3</sub> ; <sup>1</sup> H 600	168
MHz). Figura S23 — Espectro HMBC do composto J55_C9PA (CDCl <sub>3</sub> ; <sup>1</sup> H 600	169
MHz). Figura S24 — Espectro de <sup>1</sup> H do composto J55_C10 (MeOH $d_4$ ; <sup>1</sup> H 600 MHz).	170

Figura S25 — Espectro de $^{13}$ C do composto J55_C10 (MeOH $d_4$ ; $^{13}$ C 150 MHz).	171
Figura S26 — Espectro DEPT-Q do composto J55_C10 (MeOH $d_4$ ; <sup>13</sup> C 150 MHz).	172
Figura S27 — Espectro COSY do composto J55_C10 (MeOH $d_4$ ; <sup>1</sup> H 600 MHz).	173
Figura S28 — Espectro HSQC do composto J55_C10 (MeOH $d_4$ ; <sup>1</sup> H 600 MHz).	174
Figura S29 — Espectro HMBC do composto J55_C10 (MeOH $d_4$ ; <sup>1</sup> H 600 MHz).	175
Figura S30 — Espectro de <sup>1</sup> H do composto J55_C10PA (CDCl <sub>3</sub> ; <sup>1</sup> H 600 MHz).	176
Figura S31 — Espectro de <sup>13</sup> C do composto J55_C10PA (CDCl <sub>3</sub> ; <sup>13</sup> C 150 MHz).	177
Figura S32 — Espectro DEPT-135 do composto J55_C10PA (CDCl <sub>3</sub> ; <sup>13</sup> C 150 MHz).	178
Figura S33 — Espectro COSY do composto J55_C10PA (CDCl <sub>3</sub> ; ¹H 600 MHz).	179
Figura S34 — Espectro HSQC do composto J55_C10PA (CDCl <sub>3</sub> ; <sup>1</sup> H 600 MHz).	180
Figura S35 — Espectro HMBC do composto J55_C10PA (CDCl <sub>3</sub> ; <sup>1</sup> H 600 MHz).	181
Figura S36 — Espectro de <sup>1</sup> H do composto J55_C11 (MeOH <i>d</i> <sub>4</sub> ; <sup>1</sup> H 600 MHz).	182
Figura S37 — Espectro de $^{13}$ C do composto J55_C11 (MeOH $d_4$ ; $^{13}$ C 150 MHz).	183
Figura S38 — Espectro COSY do composto J55_C11 (MeOH $d_4$ ; <sup>1</sup> H 600 MHz).	184
Figura S39 — Espectro HSQC do composto J55_C11 (MeOH $d_4$ ; <sup>1</sup> H 600 MHz).	185
Figura S40 — Espectro HMBC do composto J55_C11 (MeOH $d_4$ ; <sup>1</sup> H 600 MHz).	186
Figura S41 — Espectro de <sup>1</sup> H do composto J55_C11PA (CDCl <sub>3</sub> ; <sup>1</sup> H 600 MHz).	187
Figura S42 — Espectro de <sup>13</sup> C do composto J55_C11PA (CDCl <sub>3</sub> ; <sup>13</sup> C 150 MHz).	188
Figura S43 — Espectro DEPT-135 composto J55_C11PA (CDCl <sub>3</sub> ; <sup>13</sup> C 150	189
MHz). Figura S44 — Espectro COSY do composto J55_C11PA (CDCl <sub>3</sub> ; ¹H 600	190
MHz). Figura S45 — Espectro HSQC do composto J55_C11PA (CDCl <sub>3</sub> ; <sup>1</sup> H 600	191
MHz). Figura S46 — Espectro HMBC do composto J55_C11PA (CDCl <sub>3</sub> ; ¹H 600 MHz).	192

Tabela S1 — Dados de RMN dos compostos J55\_C9 e J55\_C10 (MeOH  $d_4$ ; <sup>1</sup>H 600 MHz, <sup>13</sup>C 150 MHz).

112).					
		J55_C9		J55_C10	
	Pos.	δC, tipo	δΗ ( <i>J</i> em Hz)	δC, tipo	δΗ ( <i>J</i> em Hz)
Aglicona	1	175,7 C	_	175,7 C	_
	2	35,1 CH <sub>2</sub>	2,36 (t, 7,4)	35,1 CH <sub>2</sub>	2,36 (t, 7,5)
	3	26,2 CH <sub>2</sub>	1,63 (m)	26,2 CH <sub>2</sub>	1,63 (m)
	4	30,4 CH <sub>2</sub>	1,32	30,4 CH <sub>2</sub>	1,34
	5-12	28,7-31,2 CH <sub>2</sub>	1,29	28,7-31,2 CH <sub>2</sub>	1,29
	13	40,4 CH <sub>2</sub>	1,17	38,0 CH <sub>2</sub>	1,30 / 1,10
	14	29,3 CH	1,52	35,8 CH	1,30 (m)
	15	23,8 CH <sub>3</sub>	0,88 (d, 6,7)	30,8 CH <sub>2</sub>	1,35 / 1,14
	16	23,8 CH <sub>3</sub>	0,88 (d, 6,7)	11,9 CH₃	0,88 (t, 7,4)
	17	-	-	19,8 CH₃	0,86 (d, 6,3)
Glicose	1'	102,2 CH	5,13 (d, 3,9)	102,2 CH	5,13 (d, 3,8)
	2'	74,2 CH	3,41 (dd, 3,8-9,5)	74,2 CH	3,41 (dd, 3,8-9,2)
	3'	75,3 CH	3,69 (t, 9,3)	75,2 CH	3,70 (t, 9,3)
	4'	72,0 CH	3,25 (t, 9,5)	72,0 CH	3,25 (t, 9,5)
	5'	74,2 CH	3,87 (m)	74,2 CH	3,87 (m)
	6'	62,9 CH <sub>2</sub>	a-3,85 (m)	62,9 CH <sub>2</sub>	a-3,85 (m)
			b-3,64 (dd, 6,7-11,9)		b-3,64 (dd, 6,7-12,0)
Manose	1"	102,4 CH	4,74 (d, 1,4)	102,4 CH	4,74 (d, 1,30)
	2"	71,2 CH	4,12 (tl)	71,2 CH	4,12 (tl)
	3"	81,7 CH	3,84 (m)	81,6 CH	3,84 (m)
	4"	67,7 CH	3,86 (m)	67,7 CH	3,86 (m)
	5"	72,3 CH	3,78 (m)	72,3 CH	3,78 (m)
	6"	64,9 CH <sub>2</sub>	a-4,40 (dd, 1,8-11,7)	65,0 CH <sub>2</sub>	a-4,40 (dd, 1,7-11,7)
			b-4,23 (dd, 6,2- 11,7)		b-4,23 (dd, 6,2-11,7)
Glicerol	1"	70,3 CH <sub>2</sub>	α-3,77 (m)	70,3 CH <sub>2</sub>	a-3,77 (m)
			β-3,42 (m)		b-3,42 (m)
	2""	72,3 CH	3,79 (m)	72,3 CH	3,79 (m)
	3"	64,4 CH <sub>2</sub>	α-3,58 (dd, 5,0-11,1)	64,4 CH <sub>2</sub>	a-3,58 (dd, 5,1-11,0)
			β-3,52 (dd, 5,7-11,1)		b-3,53 (dd, 5,6-11,1)

Tabela S2 — Dados de RMN dos compostos derivados peracetilados J55\_C9PA e J55\_C10PA (MeOH  $d_4$ ; <sup>1</sup>H 600 MHz, <sup>13</sup>C 150 MHz).

		J55_C9PA		J55_C10PA	
	Pos.	δC, tipo	δH ( <i>J</i> em Hz)	δC, tipo	δH (J em Hz)
Aglicona	1	173,6 C	_	173,6 C	_
	2	34,2 CH <sub>2</sub>	2,35 (m)	34,2 CH <sub>2</sub>	2,35 (m)
	3	25,0 CH <sub>2</sub>	1,63 (m)	25,0 CH <sub>2</sub>	1,63 (m)
	4	29,4 CH <sub>2</sub>	1,32	29,3 CH <sub>2</sub>	1,32
	5-12	27,6-31,2 CH <sub>2</sub>	1,26	27,6-31,2 CH <sub>2</sub>	1,26
	13	39,2 CH <sub>2</sub>	1,16 (m)	36,8 CH <sub>2</sub>	1,28 / 1,08
	14	28,2 CH	1,52 (m)	34,6 CH	1,30 (m)
	15	22,8 CH <sub>3</sub>	0,87 (d, 6,9)	30,0 CH <sub>2</sub>	1,33 / 1,13
	16	22,8 CH <sub>3</sub>	0,87 (d, 6,9)	11,6 CH <sub>3</sub>	0,86
	17	-	-	19,4 CH₃	0,84
Glicose	1'	96,7 CH	5,26 (d, 3,6)	96,7 CH	5,26 (d, 3,7)
	2'	71,0 CH	4,78 (dd, 3,7-10,3)	70,9 CH	4,78 (dd, 3,8-10,4)
	3'	69,4 CH	5,35 (t, 9,9)	69,4 CH	5,35 (t, 10,0)
	4'	68,2 CH	5,04 (t, 9,9)	68,2 CH	5,04 (t, 9,9)
	5'	68,4 CH	4,10 (m)	68,4 CH	4,10 (m)
	6'	61,9 CH <sub>2</sub>	α-4,31 (dd, 4,1-12,5)	61,9 CH <sub>2</sub>	α-4,30 (dd, 4,3-12,4)
			β-4,06 (dd, 1,9-12,5)		β-4,05 (dd, 2,0-12,4)
Manose	1"	97,8 CH	4,84 (sl)	97,8 CH	4,84 (sl)
	2"	70,6 CH	5,21 (m)	70,6 CH	5,20 (dd, 1,4-3.5)
	3"	72,7 CH	4,18 (dd, 3,6-9,8)	72,7 CH	4,18 (dd, 3,7-9,7)
	4"	68,3 CH	5,30 (t, 9,9)	68,2 CH	5,29 (t, 10,0)
	5"	69,1 CH	3,84 (m)	69,1 CH	3,83 (m)
	6"	62,4 CH <sub>2</sub>	α-4,19 (m)	62,4 CH <sub>2</sub>	α-4,19 (dd, 5,6-12,3)
			β-4,08 (m)		β-4,08 (dd, 2,3-12,6)
Glicerol	1"	66,4 CH <sub>2</sub>	α-3,80 (dd, 5,1-11,1)	66,4 CH <sub>2</sub>	α-3,80 (dd, 4,8-11,0)
			β-3,64 (dd, 6,0-11,1)		β-3,64 (dd,6,2-11,0)
	2"	70,0 CH	5,21 (m)	70,0 CH	5,21 (m)
	3"	62,4 CH <sub>2</sub>	α-4,32 (dd, 4,1-12,0)	62,4 CH <sub>2</sub>	α-4,32 (dd, 4,0-12,3)
			β-4,15 (dd, 5,8-12,0)		β-4,14 (dd, 6,0-12,1)

Figura S1 — Espectro de  $^{1}$ H do composto J55\_C8 (MeOH  $d_4$ ;  $^{1}$ H 600 MHz).

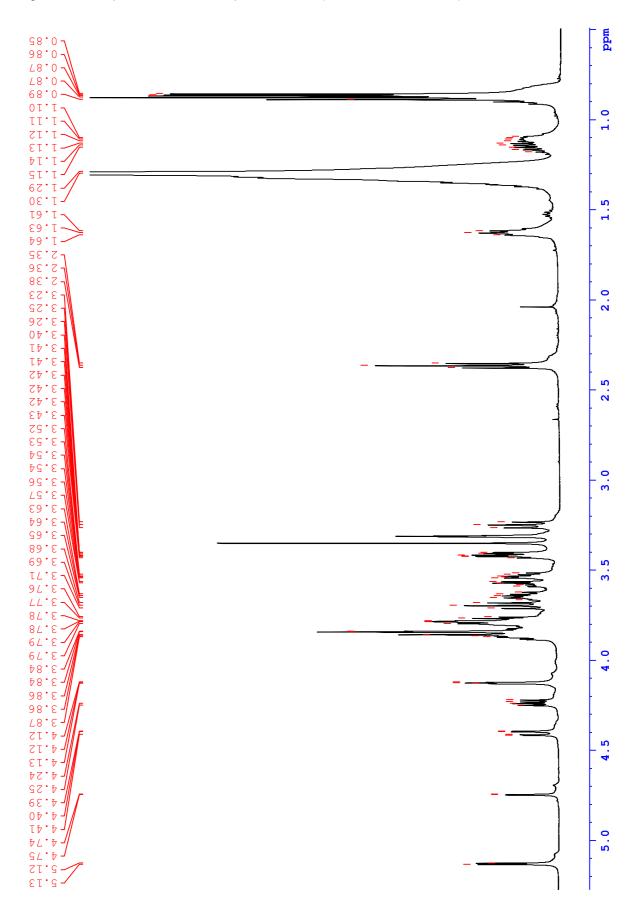


Figura S2 — Espectro de  $^{13}$ C do composto J55\_C8 (MeOH  $d_4$ ;  $^{13}$ C 150 MHz).

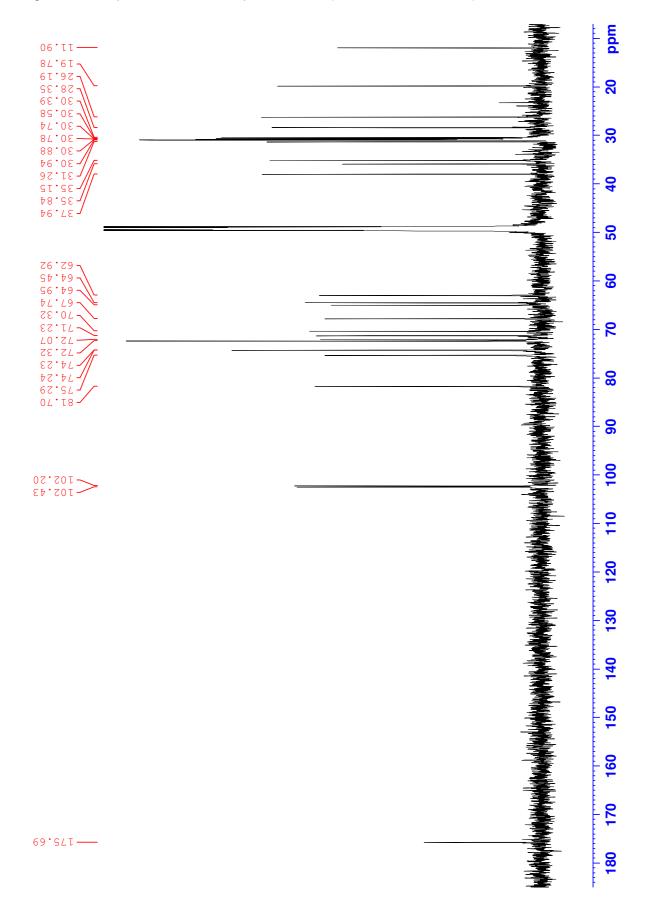
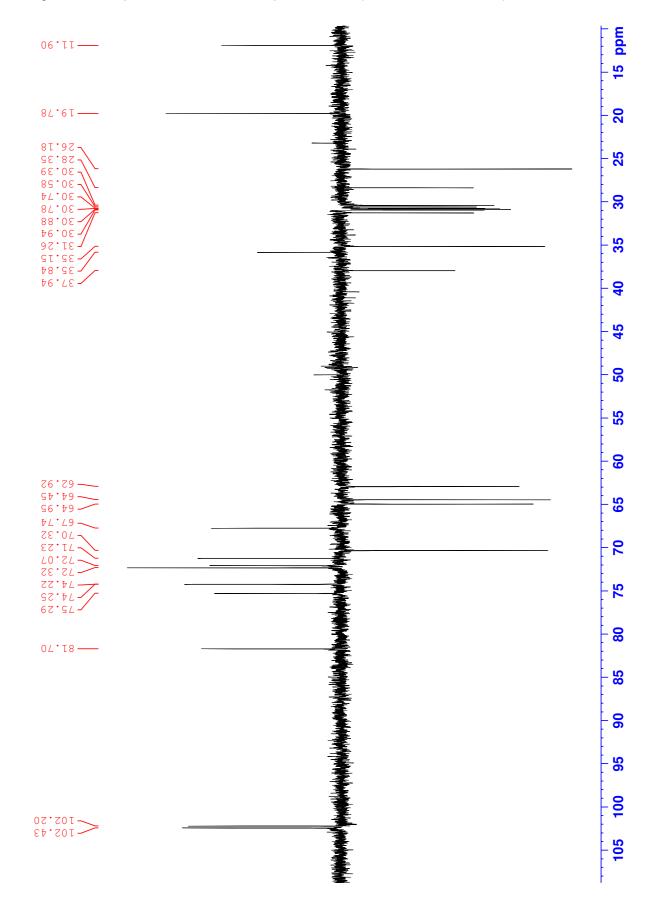


Figura S3 — Espectro DEPT-135 do composto J55\_C8 (MeOH  $d_4$ ; <sup>13</sup>C 150 MHz).



-5.5 ppm - 5.0 1.5 2.0 2.5 3.0 3.5 5.0

Figura S4 — Espectro COSY do composto J55\_C8 (MeOH  $d_4$ ;  $^1$ H 600 MHz).

mdd mdd 9 20 30 40 20 20 80 09 **6** 100 **?**: 1.5 2.0 2.5 3.5 4.0 4.5 2.0

Figura S5 — Espectro HSQC do composto J55\_C8 (MeOH  $d_4$ ; <sup>1</sup>H 600 MHz).

mdd 20 09 100 - 180 40 80 - 160 1.0 5.0 2.5 3.0 3.5 4.0 2.0

Figura S6 — Espectro HMBC do composto J55\_C8 (MeOH  $d_4$ ; <sup>1</sup>H 600 MHz).

mdd 48.0 -68.0 **68.0** 98.0 1.0 98.0 78.0 -78.0 -**68.0** -11/1-£1.17 1.5 41.17 91.1-1.26 49.1-00.2 90.2 2.0 80.2 -01.2-11.5 42.24 2.35 2.35 2.5 3.65 99.6 **6**Σ.Σ 3.80 3.82 40.4 3.0 90.4 70.4· **71.4** 4.15 91.4 11.4 3.5 71.4. 81.4-81.4-61.4 4.29 05.4-4.0 15.4 15.4 4.33 77.4· **77.**4 6Z.4 6Z.4 -48.4 48.4 40.6 6.20 6.20 5.0 6.20 12.2 5.25 5.26 62.2 98.3 -

Figura S7 — Espectro de <sup>1</sup>H do composto J55\_C8PA (CDCl<sub>3</sub>; <sup>1</sup>H 600 MHz).

Figura S8 — Espectro de  $^{13}$ C do composto J55\_C8PA (CDCl<sub>3</sub>;  $^{13}$ C 150 MHz).

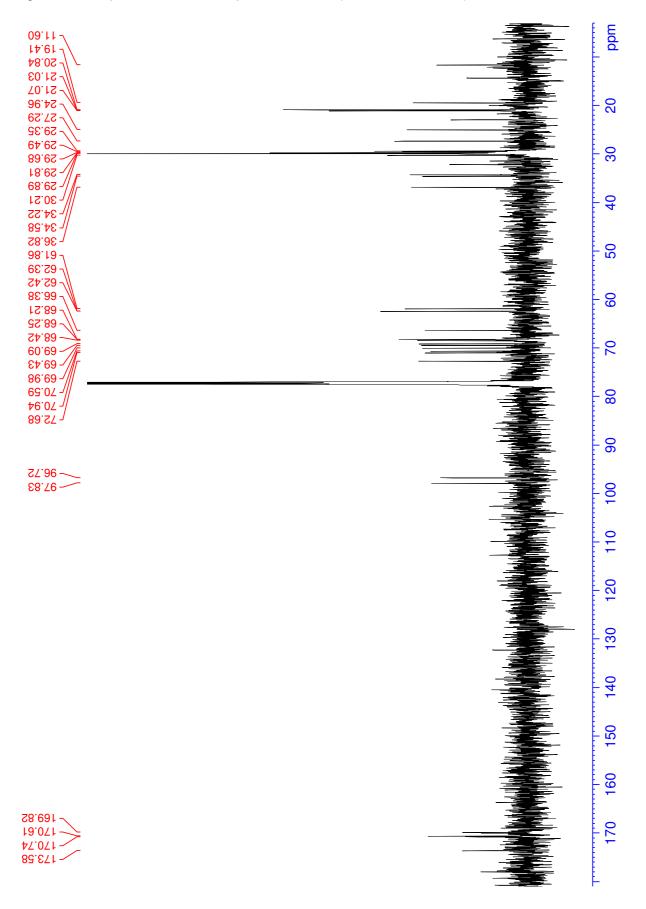
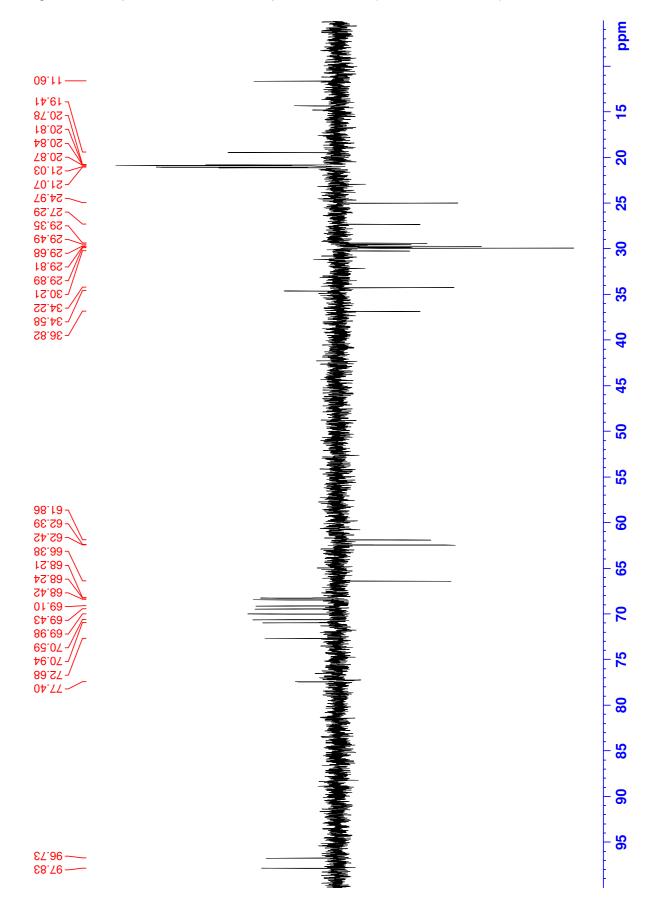


Figura S9 — Espectro DEPT-135 do composto J55\_C8PA (CDCl $_3$ ;  $^{13}$ C 150 MHz).



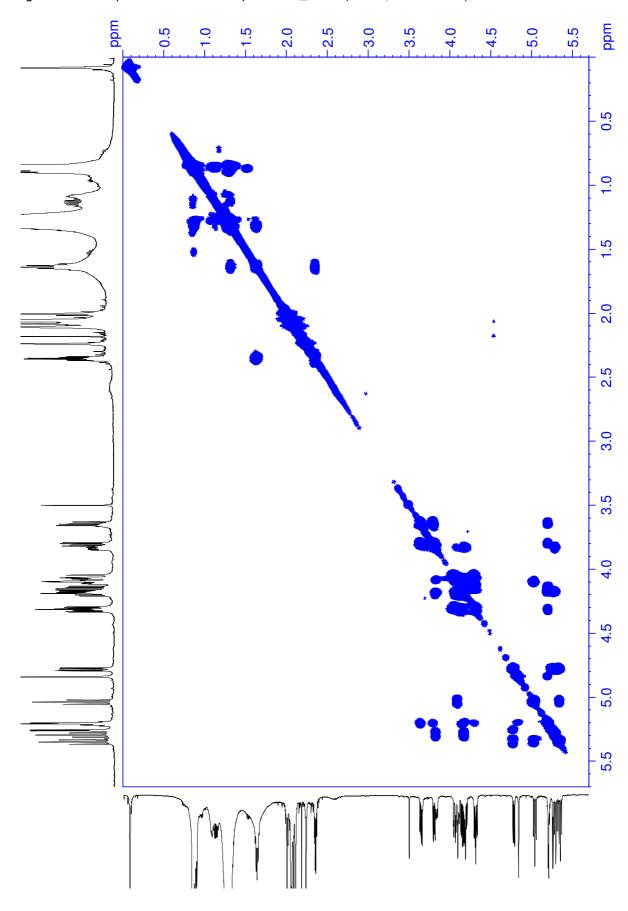


Figura S10 — Espectro COSY do composto J55\_C8PA (CDCl<sub>3</sub>; <sup>1</sup>H 600 MHz).

9 40 mdd 20 30 20 90 20 80 100 90 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 4.5 5.0 5.5

Figura S11 — Espectro HSQC do composto J55\_C8PA (CDCl<sub>3</sub>; <sup>1</sup>H 600 MHz).

40 20 90 80 - 100 ppm - 160 - 180 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 3.5 4.0 4.5 2.0 5.5

Figura S12 — Espectro HMBC do composto J55\_C8PA (CDCl<sub>3</sub>; <sup>1</sup>H 600 MHz).

Figura S13 — Espectro de <sup>1</sup>H do composto J55\_C9 (MeOH  $d_4$ ; <sup>1</sup>H 600 MHz).

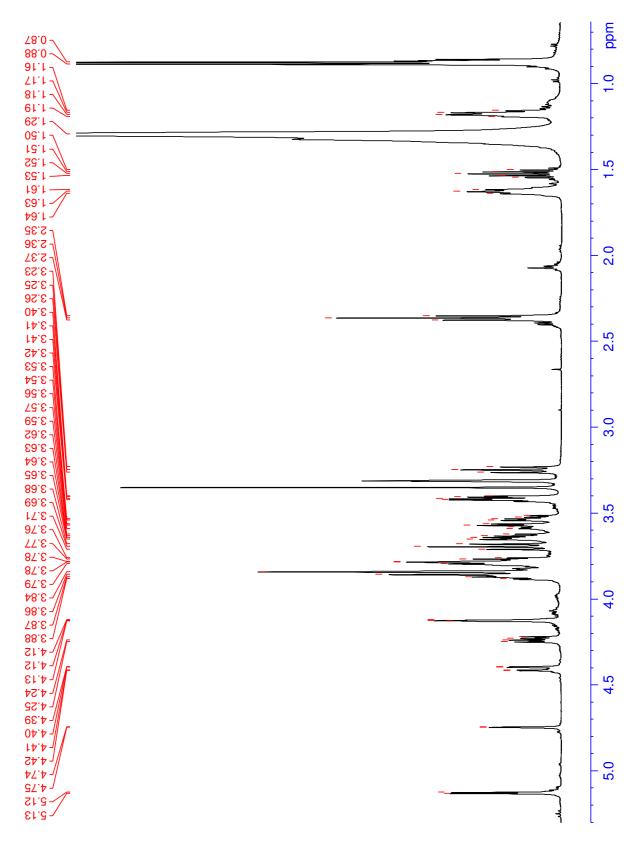
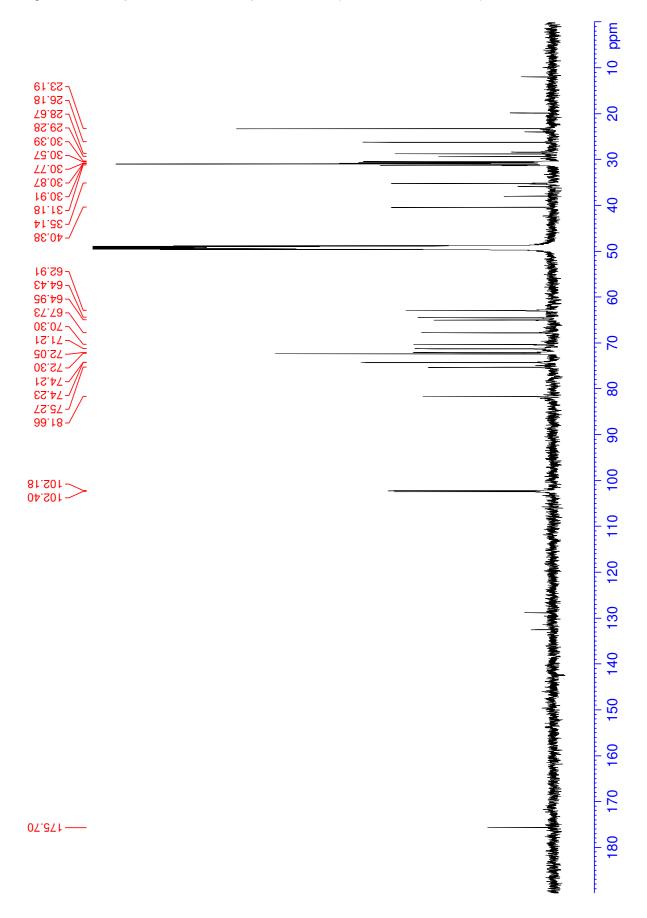


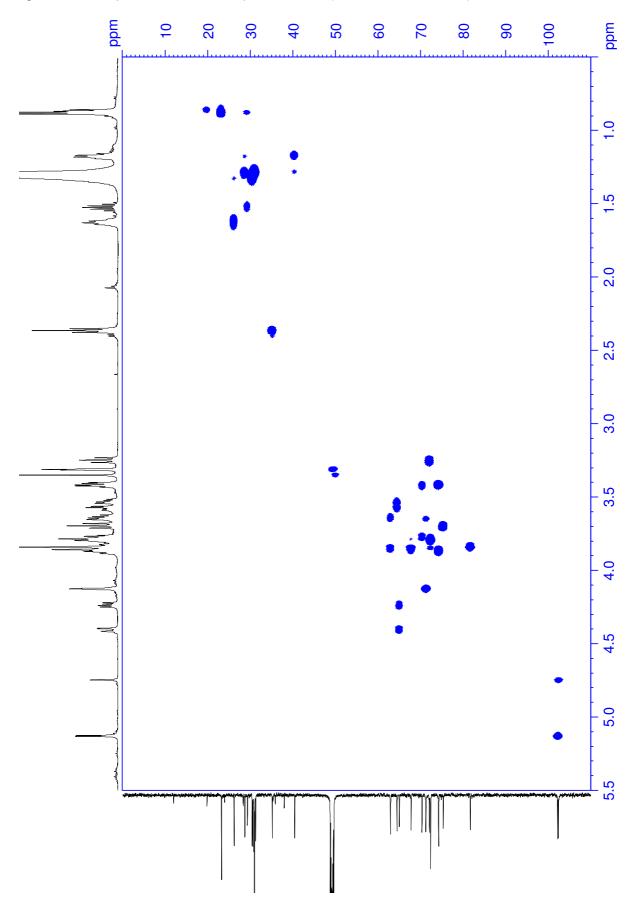
Figura S14 — Espectro de  $^{13}$ C do composto J55\_C9 (MeOH  $d_4$ ;  $^{13}$ C 150 MHz).



- 5.0 3.0 1.0 1.5 2.0 3.0 3.5 4.0 4.5 2.0

Figura S15 — Espectro COSY do composto J55\_C9 (MeOH  $d_4$ ; <sup>1</sup>H 600 MHz).

Figura S16 — Espectro HSQC do composto J55\_C9 (MeOH  $d_4$ ; <sup>1</sup>H 600 MHz).



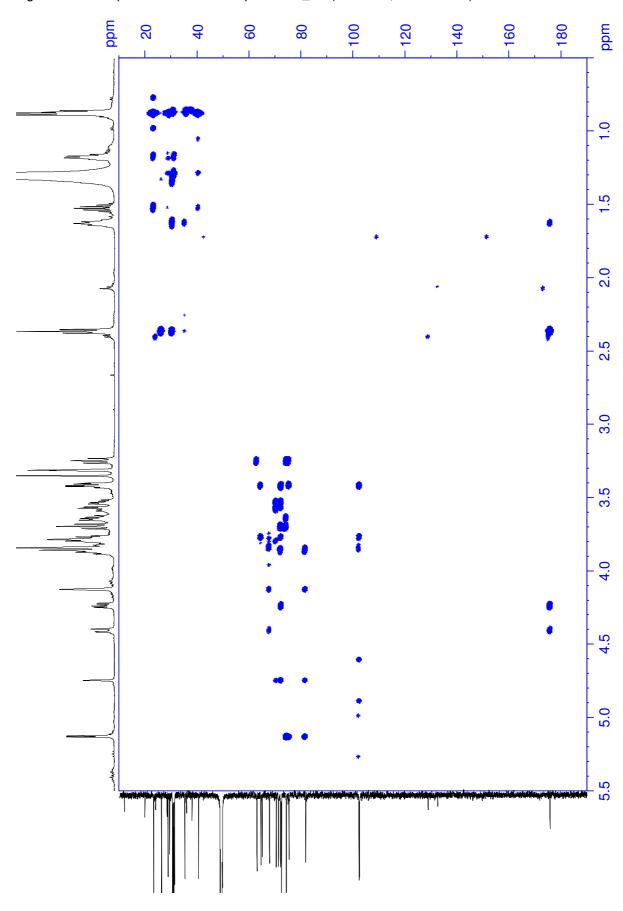
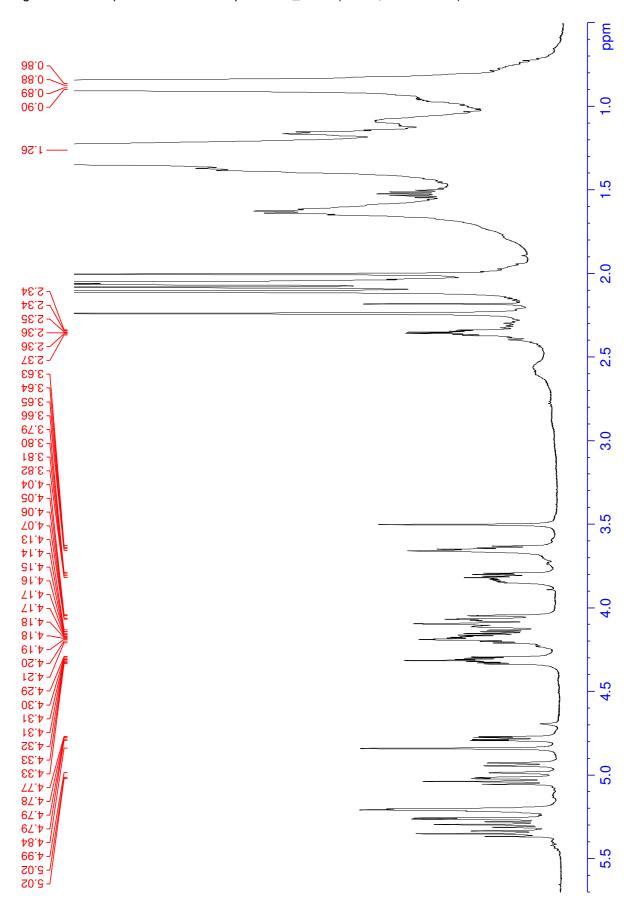


Figura S17 — Espectro HMBC do composto J55\_C9 (MeOH  $d_4$ ; <sup>1</sup>H 600 MHz).

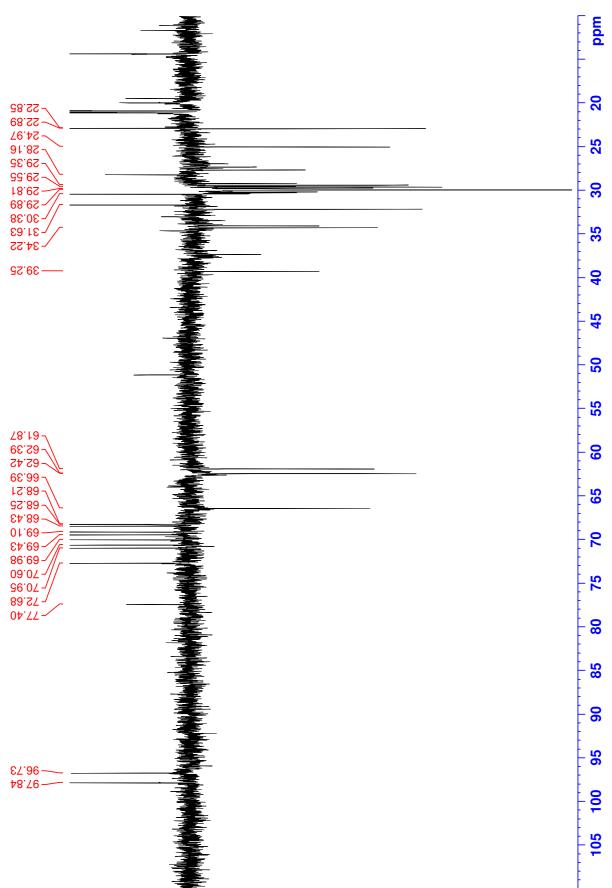
Figura S18 — Espectro de <sup>1</sup>H do composto J55\_C9PA (CDCl<sub>3</sub>; <sup>1</sup>H 600 MHz).



mdd 14.31 18.02 48.02 9 21.03 70.12-22.85 88.22 20 76.42-82.72-19.72-30 91.82-29.35 -29.52 07.62-40 10.46-86.06-34.22 50 39.25 78.18 62.42 66.39 9 12.89 64.89 01.69-£4.69-86.69 09.07 -96.07 -80 89.27-90 £7.39 ~ 48.79 100 120 130 140 150 98.691-96.691-170.27 19.071-07.071-173.59

Figura S19 — Espectro de <sup>13</sup>C do composto J55\_C9PA (CDCl<sub>3</sub>; <sup>13</sup>C 150 MHz).

Figura S20 — Espectro de DEPT-135 do composto J55\_C9PA (CDCl $_3$ ;  $^{13}\text{C}$  150 MHz).



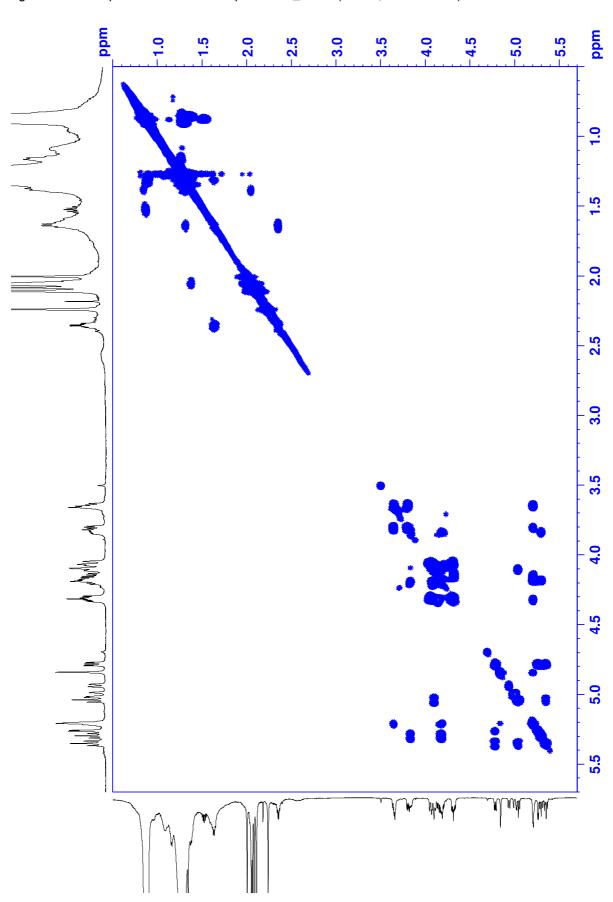
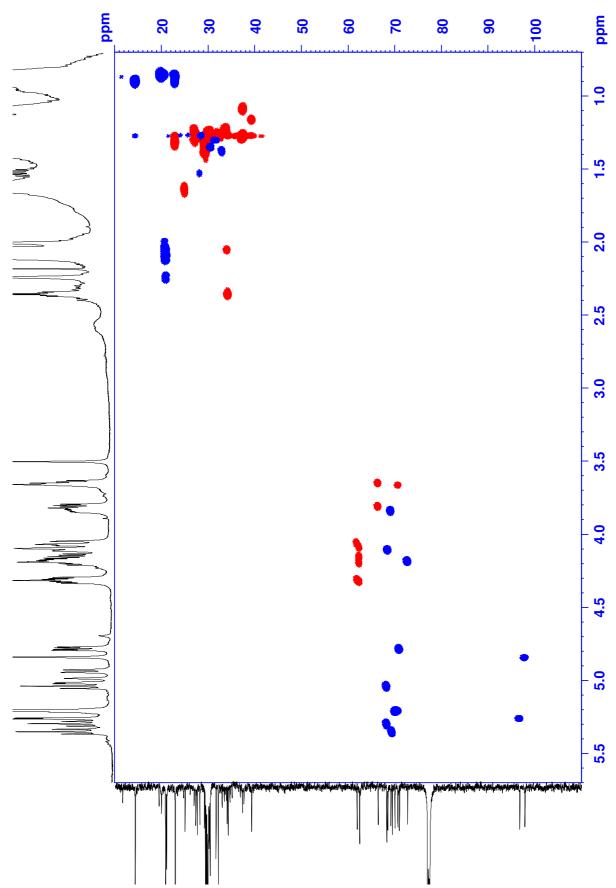


Figura S21 — Espectro COSY do composto J55\_C9PA (CDCl<sub>3</sub>; <sup>1</sup>H 600 MHz).

Figura S22 — Espectro HSQC do composto J55\_C9PA (CDCl3;  $^1\mathrm{H}$  600 MHz).



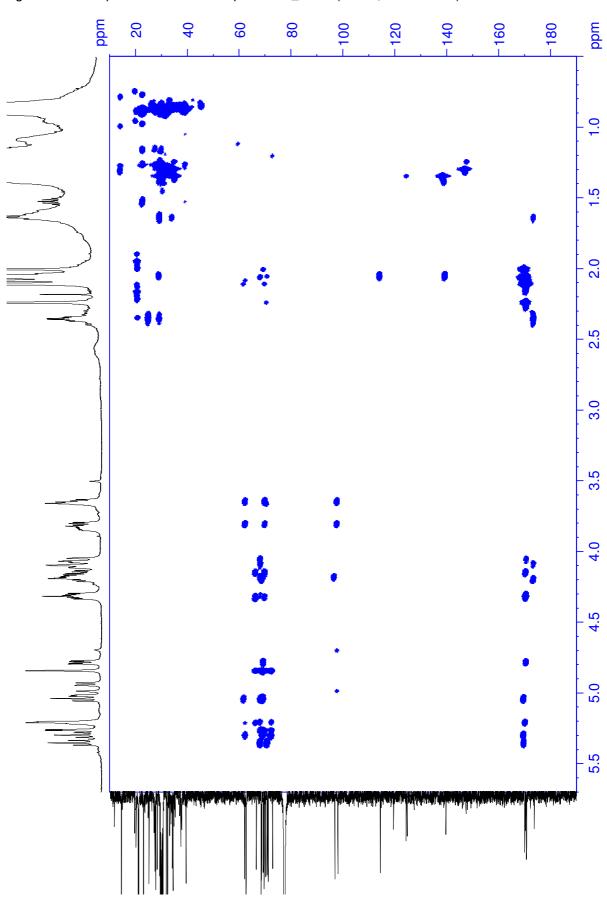


Figura S23 — Espectro HMBC do composto J55\_C9PA (CDCl<sub>3</sub>; <sup>1</sup>H 600 MHz).

Figura S24 — Espectro de <sup>1</sup>H do composto J55\_C10 (MeOH *d*<sub>4</sub>; <sup>1</sup>H 600 MHz).

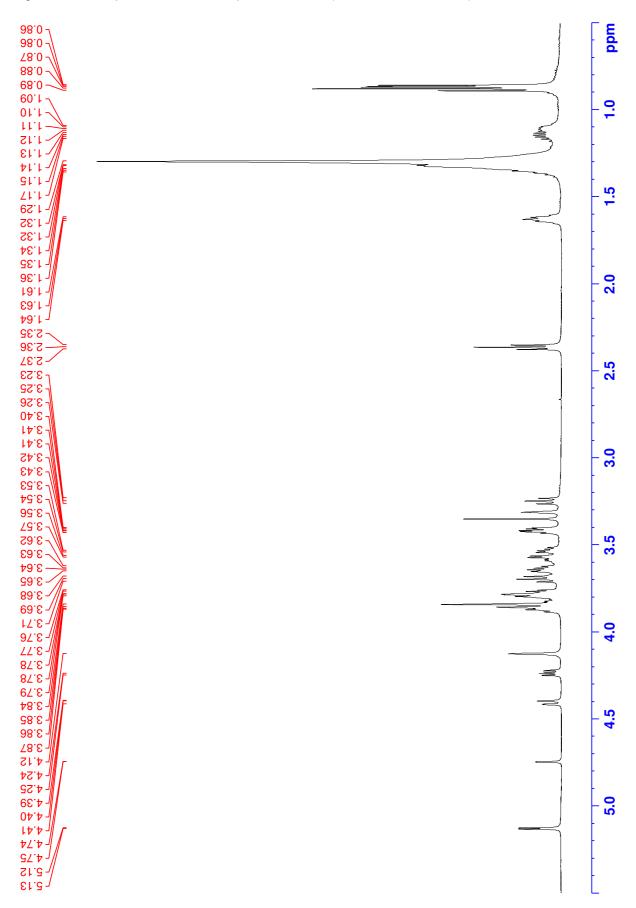
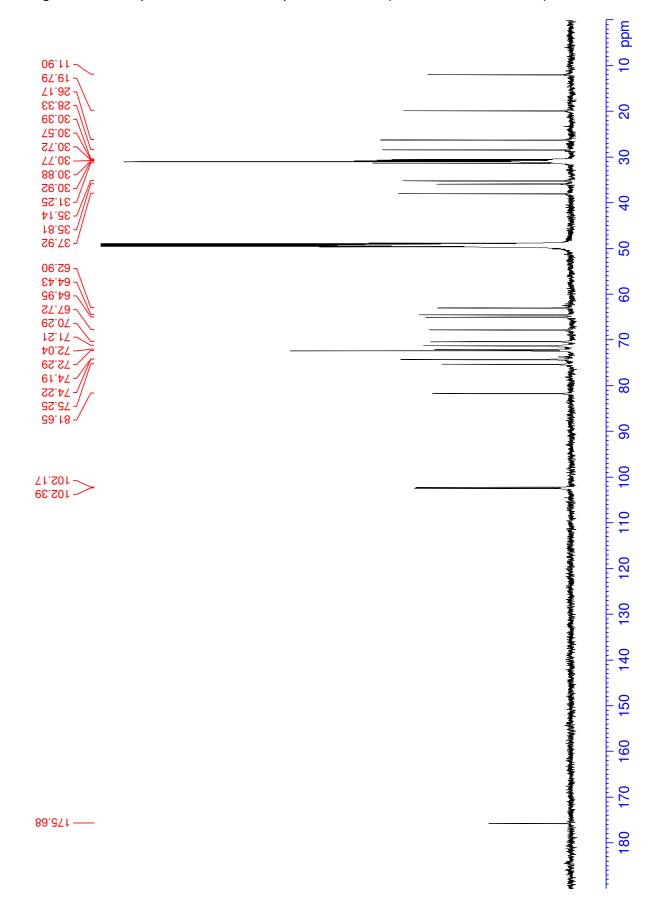


Figura S25 — Espectro de  ${}^{13}$ C do composto J55\_C10 (MeOH  $d_4$ ;  ${}^{13}$ C 150 MHz).



mdd 06.11~ 9 87.61-81.32--28.33 20 65.05-89.08~ £7.0£-87.05~ 30 88.05~ 26.05~ <del>1</del>6.0€ √ **4** 31.25 41.357 28.35 20 £6.7£ 7 16.29 -64.43 90 96.49-£7.73 -05.07~ 12.17-2 - 72.05 72.30 02.47-8 ES.47-7 92.27<sub>7</sub> 99.18 J 06 100 71,201~ 102.40 120 130 140 150 160 170 89.271---180

Figura S26 — Espectro DEPT-Q do composto J55\_C10 (MeOH  $d_4$ ; <sup>13</sup>C 150 MHz).

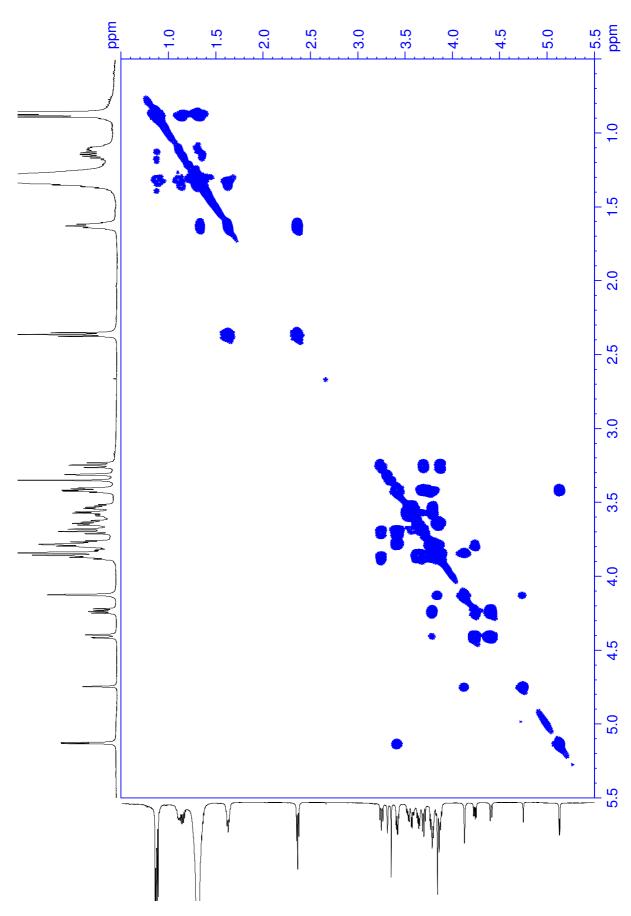


Figura S27 — Espectro COSY do composto J55\_C10 (MeOH  $d_4$ ; <sup>1</sup>H 600 MHz).

Figura S28 — Espectro HSQC do composto J55\_C10 (MeOH  $d_4$ ; <sup>1</sup>H 600 MHz). mdd 9 20 30 20 09 20 80 06 - 100 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 3.5 4.5 2.0

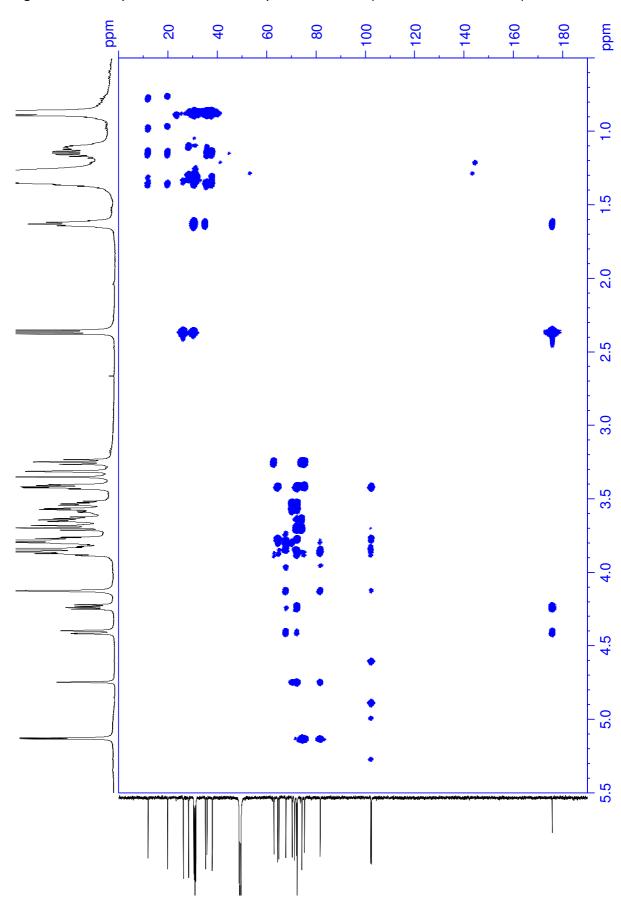
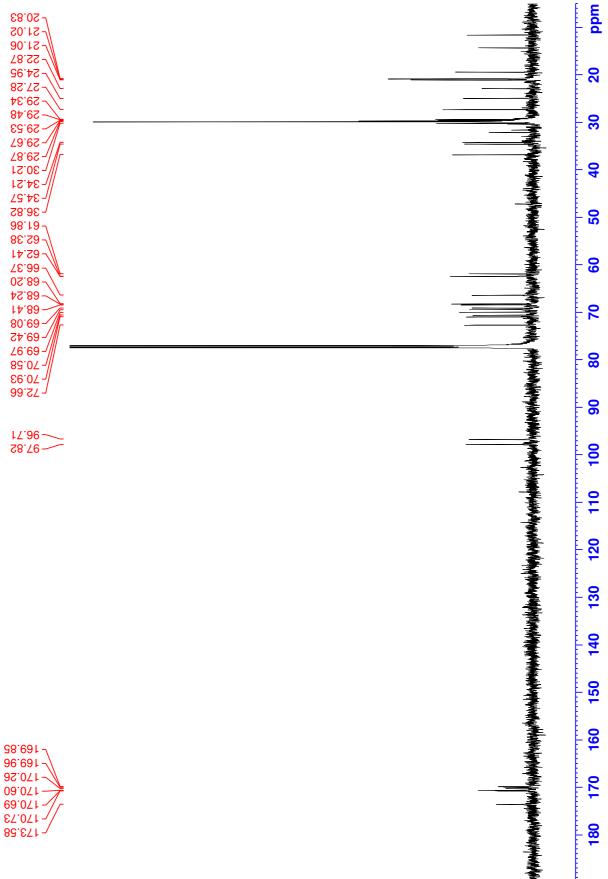


Figura S29 — Espectro HMBC do composto J55\_C10 (MeOH  $d_4$ ; <sup>1</sup>H 600 MHz).

98.0 mdd 98.0 68.0 -1.13 41.14 1.0 1.26 £9.1--2.00 -2.05 80.2 --2.10 01.2-1.5 52.23 - 2.35 2.35 49.5 3.65 3.66 2.0 64.E-08.6 -18.6-40.4 40.4 90.4 90.4-70.4-60.4-60.4-41.4-91.4-3.0 91.4-71.4-71.4-81.42 81.42 61.42 61.42 3.5 15.42 18.4 ZE.4-65.4 4.0 77.4-87.4 6Z.₽ 48.4 20.6 4.5 50.3 60.6 02.6 - 5.20 6.20 92.6-- 5.25 5.0 92.6 5.28 62.2 16.3 5:33 98.3-5.5 95.3 -

Figura S30 — Espectro de <sup>1</sup>H do composto J55\_C10PA (CDCl<sub>3</sub>; <sup>1</sup>H 600 MHz).

Figura S31 — Espectro de <sup>13</sup>C do composto J55\_C10PA (CDCl<sub>3</sub>; <sup>13</sup>C 150 MHz).



70

75

80

85

90

95

100

105

mdd 69.11 —— 15 04.61-20 - 29.49 - 29.35 - 24.95 25 18.36.7 12.46.7 12.46.7 11.26.7 11.26.7 18.62.7 18.62.7 18.62.7 18.62.7 30 35 40 45 50 55 9 **98.19** 85.39 -14.28-86.39 65 02.89 68.23 14.89 -80.69 -

86.07 -86.07 -76.69 -79.69 -24.69 -

04.77 ----

28.79 —

Figura S32 — Espectro DEPT-135 do composto J55\_C10PA (CDCl $_3$ ;  $^{13}$ C 150 MHz).

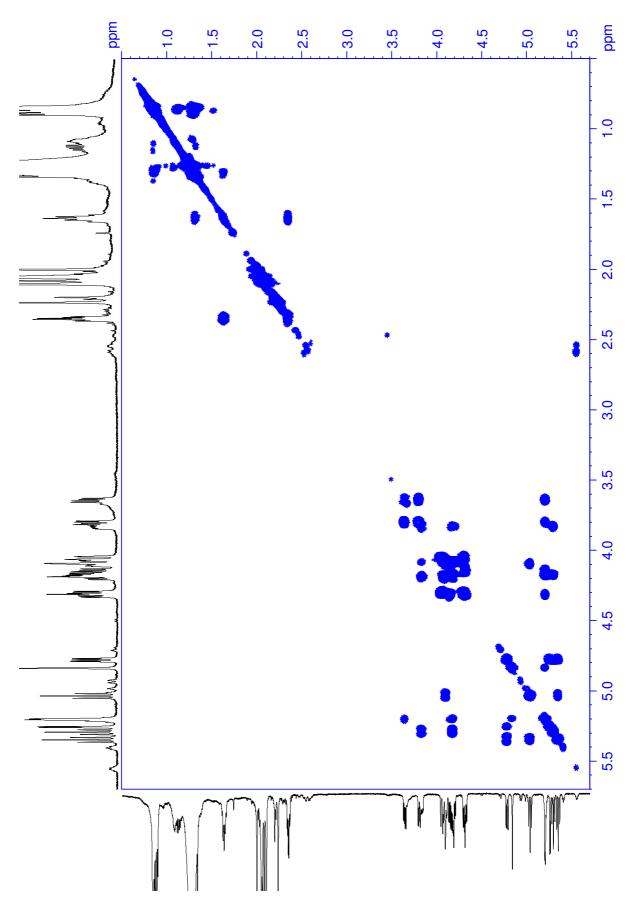
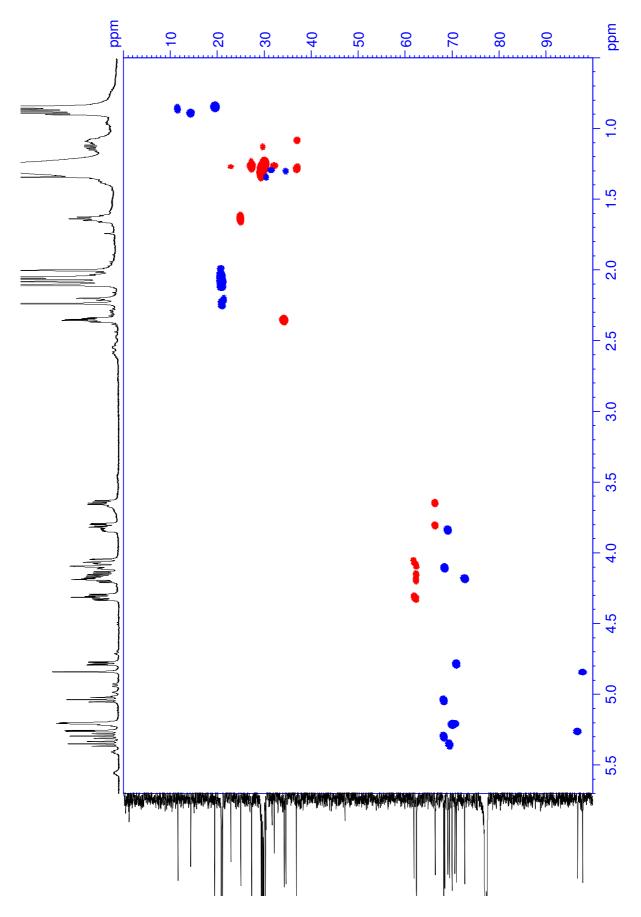


Figura S33 — Espectro COSY do composto J55\_C10PA (CDCl<sub>3</sub>; <sup>1</sup>H 600 MHz).

Figura S34 — Espectro HSQC do composto J55\_C10PA (CDCl<sub>3</sub>; <sup>1</sup>H 600 MHz).



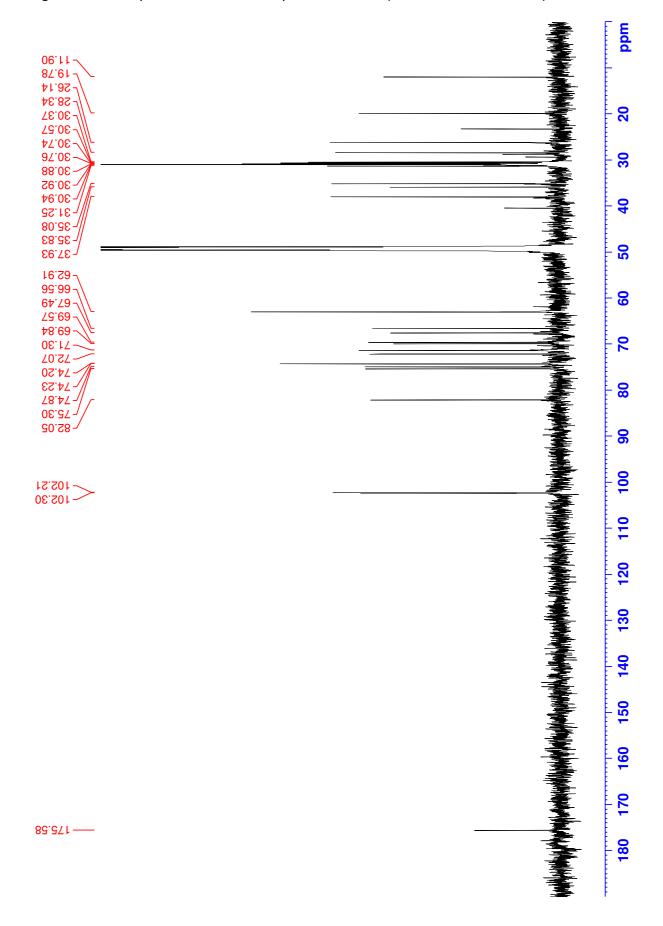
40 mdd 20 90 80 - 100 - 180 1.0 1.5 2.0 3.0 2.0 2.5

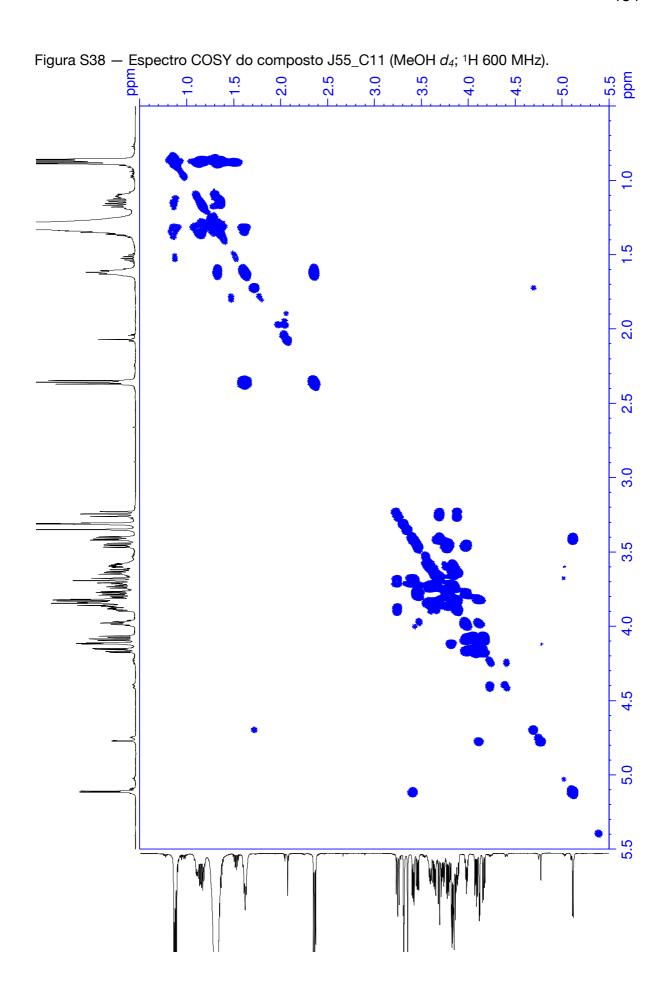
Figura S35 — Espectro HMBC do composto J55\_C10PA (CDCl<sub>3</sub>; <sup>1</sup>H 600 MHz).

98.0 <sup>7</sup> mdd 78.0 88.0 68.0 51.1-0. 41.1-41.1-91.1-71.1-81.1 -1.29 1.5 19.1 29.1-£9.1 2.35 2.36 75.5 3.23 2.0 42.8-92.8 3.40 0⊅.£-14.6-3.45 44.6 -2.5 3.45 94.6 74.6 29.6 -£8.63 49.6-3.0 39.6 89.6 69°E 17.6-17.6 -£7.£ <sup>2</sup> 47.6 -3.5 9<mark>Ζ.</mark>ε -77.8 87.8 3.79 3.82 28.6 -£8.6 ~ 38.6 -86.6 -70.4~ 80.4~ 60.4 J 01.47 4.5 11.4-11.4 21.47 21.4-21.47 91.47 71.4-5.0 81.47 77.4 J 11.3~ 51.2

Figura S36 — Espectro de <sup>1</sup>H do composto J55\_C11 (MeOH *d*<sub>4</sub>; <sup>1</sup>H 600 MHz).

Figura S37 — Espectro de  $^{13}$ C do composto J55\_C11 (MeOH  $d_4$ ;  $^{13}$ C 150 MHz).





mdd mdd **9** 20 30 20 20 **4**0 09 80 <del>00</del> 100 1.0 1.5 2.0 3.0 3.5 4.0 4.5 2.0 2.5

Figura S39 — Espectro HSQC do composto J55\_C11 (MeOH  $d_4$ ; <sup>1</sup>H 600 MHz).

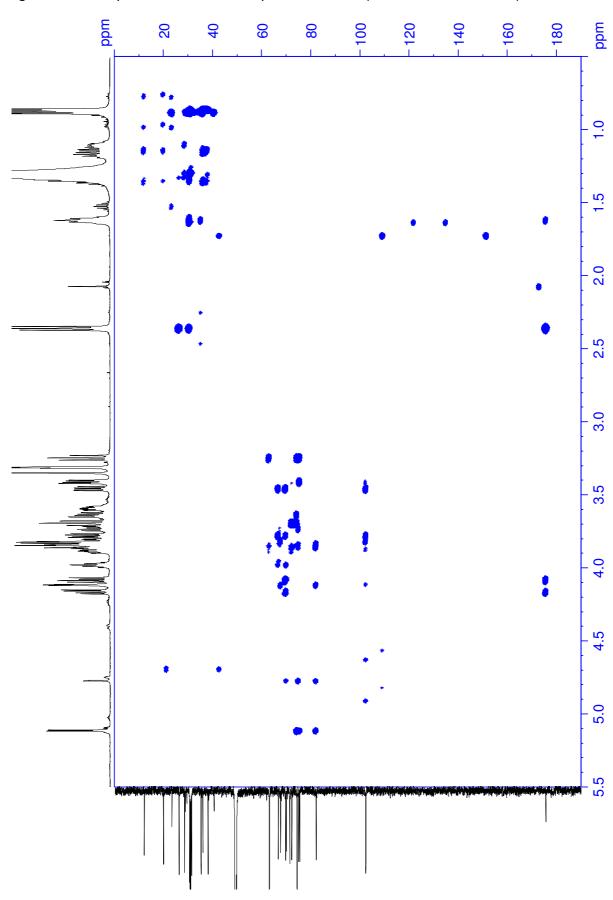


Figura S40 — Espectro HMBC do composto J55\_C11 (MeOH  $d_4$ ; <sup>1</sup>H 600 MHz).

mdd 648.0 -198.0 **G78.0** 978.0 888.0 006.0 -0. 1.263 886.1-109.1-£19.1 1.625 £49.1-1.5 9**3**9.1--2.305 2.316 815.5 2.330 3.642 2.0 3.650 099.8 3.799 3.806 718.6 428.6-940.4 £90.4-**₹**90.4 170.4 **670.4** 981.4 3.0 971.4 991.4 991.4-171.4-771.4-781.4· 3.5 691.4-661.47 4.208 162.4-4.299 4.312 4.319 4.332 4.339 694.4 **GTT.4-**987.4-4.5 £67.4-**6**8.4-148.4 810.8-5:035 130.3 -5.0 012.8-762.6 5.264 5.282 862.3-915.3-5.5 266.3-678.37 998.3

Figura S41 — Espectro de <sup>1</sup>H do composto J55\_C11PA (CDCl<sub>3</sub>; <sup>1</sup>H 600 MHz).

<del>1</del>80

mdd **₽8**.02 ¬ 16.02-50.12-0 70.12-88.52-**9 P0.82**-08.72-41.62 28.92 20 -29.35 94.62-99.62-30 -29.69 88.62~ 22.08 -40 86.06-10.46-12.48-20 69.48-£8.8£ -82.78-9 88.19-71,28-82.59~ 2 95.99~ 12.89-44.89 -**†**0.69 -80 24.69-£1.07-69.07 <sub>]</sub> 8 26.07 J 72.67 26.79 £7.96 100 190 120 130 140 150 160

34.871---

Figura S42 — Espectro de <sup>13</sup>C do composto J55\_C11PA (CDCl<sub>3</sub>; <sup>13</sup>C 150 MHz).

mdd 9 69.11 —— 15 19.45 20 25 - 29.54 08.62 28.62 -3 - 29.89 12.06 -29.16~ 12.45 35 85.75 4 45 20 22 78.19-09 71.29 -85.29 95.99 -65 12.89 -44.89 £0.69 -2 24.69 - 70.13 69.07 -96.07 -75 79.27 -04.77 -- 8 85 - 06 92 27.39 — 26.79 —

Figura S43 — Espectro DEPT-135 composto J55\_C11PA (CDCl<sub>3</sub>; <sup>13</sup>C 150 MHz).

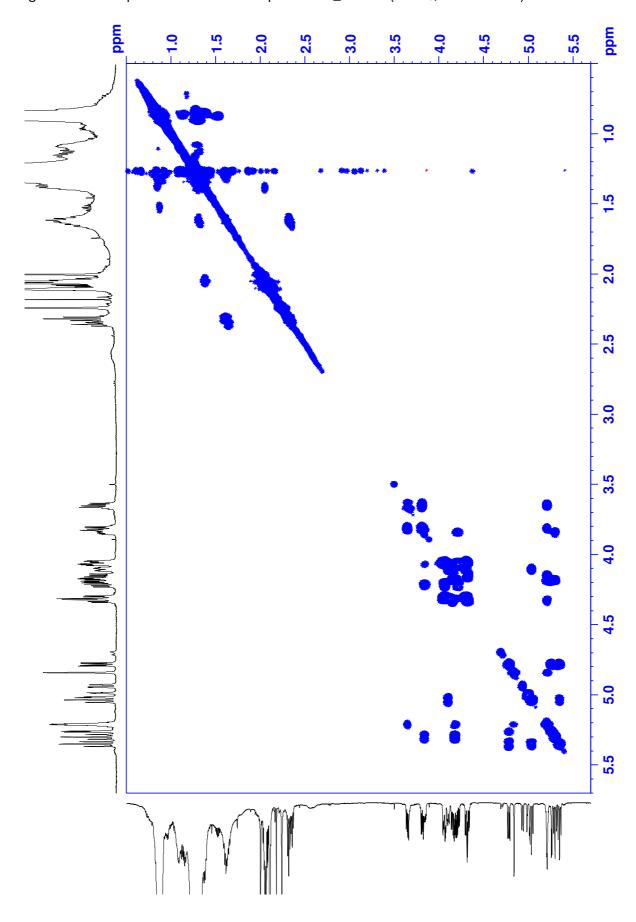


Figura S44 — Espectro COSY do composto J55\_C11PA (CDCl<sub>3</sub>; <sup>1</sup>H 600 MHz).

9 20 30 40 20 80 mdd 9 70 90 100 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 3.5 4.5 5.0 5.5

Figura S45 — Espectro HSQC do composto J55\_C11PA (CDCl<sub>3</sub>; <sup>1</sup>H 600 MHz).

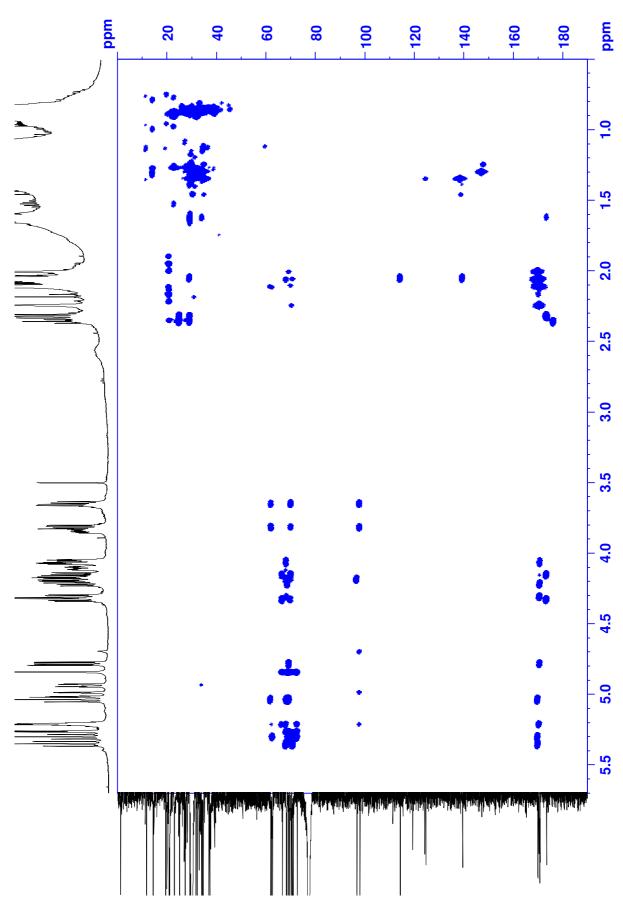


Figura S46 — Espectro HMBC do composto J55\_C11PA (CDCl<sub>3</sub>; <sup>1</sup>H 600 MHz).