UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Investigação química e biológica de microrganismos marinhos e o
uso de redes moleculares como ferramenta na busca por
substâncias bioativas em cianobactérias marinhas do gênero
*Symploca***

Lorene Armstrong

Ribeirão Preto

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Investigação química e biológica de microrganismos marinhos e o
uso de redes moleculares como ferramenta na busca por
substâncias bioativas em cianobactérias marinhas do gênero
*Symploca***

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

Área de Concentração: Produtos Naturais e
Sintéticos

Orientado(a): Lorene Armstrong

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

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas no dia 18/11/2016. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2016

FICHA CATALOGRÁFICA

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.

Armstrong, Lorene

Investigação química e biológica de microrganismos marinhos e o uso de redes moleculares como ferramenta na busca por substâncias bioativas em cianobactérias marinhas do gênero *Symploca*. Ribeirão Preto, 2016.
152 p.; 30cm.

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

Orientadora: Debonisi, Hosana Maria.

1. Cianobactéria. 2. *Cyanobium*. 3. *Penicillium* 4. Co-cultura. 5. *Symploca*. 6. Rede molecular. 7. Caracolamida A. 8. Polimetóxi-1-alqueno isotático

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Lorene Armstrong

Título do trabalho: Investigação química e biológica de microrganismos marinhos e o uso de redes moleculares como ferramenta na busca por substâncias bioativas em cianobactérias marinhas do gênero *Symploca*.

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

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

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

Aprovado em: 18/11/2016

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS/ACKNOWLEDGEMENTS

Agradeço a Deus por guiar os meus caminhos e me proporcionar acontecimentos especiais e a suportar os momentos mais árduos dessa trajetória;

À minha mãe e à minha avó pelo apoio, suporte, incentivo e compreensão recebidos neste momento da minha vida;

Aos meus sobrinhos Davi e Raul por serem alegria constante em minha vida;

À Profa. Dra. Hosana Maria Deboni pela orientação e oportunidade de trabalhar no laboratório;

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP pela infraestrutura na realização deste projeto;

À Profa. Dra. Marli de Fátima Fiore (CENA-USP) e aos doutores Marcelo Gomes Marçal Vieira Vaz e Diego Bonaldo Genuário pelas linhagens de cianobactérias concedidas neste estudo e pela colaboração neste trabalho agregando conhecimento;

Aos meus amigos queridos Ezequiane, Gabriel e Olívia pela amizade, companheirismo e apoio que foram fundamentais nessa jornada;

Aos alunos do grupo QOAM (Química Orgânica do Ambiente Marinho): Ana Lígia, Ana Paula, Bárbara, Rafael e Vitor pela amizade e troca de conhecimentos;

A todos os meus amigos que fizeram parte desse momento sempre me dando incentivo, força e compreensão: Américo Moraes Neto, Andreza Gambelli Lucas, Anna Karoline Aguiar, Andréa Garcia Franco, Celina de Andrade Urban, Desiree Nascimento, Dora Miranda, Elaine Prandel, Eliane Santos, Laryssa Rocha, Lynette Bueno Perez, Milene Valéria Lopes, Patrícia Mazureki Campos, Raphael Prestes Salem, Renata Guimarães Bernardes;

Aos meus amigos do grupo NPPNS (Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos-FCFRP-USP) pelos momentos compartilhados;

Às amigas e Professoras da dança;

A todos que sempre incentivaram a realização deste doutorado;

Aos funcionários do grupo NPPNS (Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos-FCFRP-USP): Daniela Engracia pelos cuidados com as culturas do laboratório; José Carlos Tomaz pela realização das análises em espectrometria de massas e Izabel Cristina Turatti pela realização das análises de CG-MS;

Aos alunos do grupo NPPNS Lucas Maciel Marques e Anelize Bauermeister pelas análises de espectrometria de massas;

Ao Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes (FFCLRP-USP) pela disponibilização dos equipamentos e materiais e ao técnico Eduardo José Crevelin pela realização das análises em CLAE-DAD e espectrometria de massas;

À Profa. Dra. Niede A.J.C. Furtado pela colaboração nos ensaios antimicrobianos, em especial à técnica Maria Angélica Chellegatti pela realização dos mesmos e pela dedicação e amizade;

À Profa. Dra. Maria Cláudia Marx Young (IBOT-SP) pela colaboração nas atividades antifúngica e anticolinesterásica;

Ao Prof. Dr. Ernani Pinto Jr. (Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP-SP) pelas análises para verificação de cianotoxinas;

Aos técnicos Vinícius Palaretti (FFCLRP-USP) e Nivaldo Boralle (UNESP-Araraquara), pela realização das análises de RMN;

To Dr. William Gerwick and Dr. Lena Gerwick (Scripps Institution of Oceanography, California) who gave me a great opportunity to work in their lab and for all the knowledge received;

To all the people in the Gerwick lab for the welcome and support I received during that time; especially to Dr. Evgenia Glukov and Dr. C. Benjamin Naman for their contributions, and for the transmitted knowledge and help with my work;

To Dr. Jair Lage de Siqueira-Neto (Skaggs School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences-UCSD, California, EUA) for his collaboration on antiparasitic assays and to Dr. Laura-Isobel McCall (*Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* sp. assays) and Dr. Katerina Otrubova (*T. brucei* assay);

To Dr. Thomas F. Murray, Creighton University School of Medicine (Omaha, Nebraska) for his collaboration on neuromodulatory assays and to Dr. Marsha L. Pierce for performing them;

Aos amigos do Brasil e dos Estados Unidos pelo companheirismo durante a realização do doutorado-sanduíche que tornaram este momento muito especial;

Ao CNPq e Ciência sem fronteiras pelo auxílio financeiro recebido durante o doutorado.

RESUMO

ARMSTRONG, L. **Investigação química e biológica de microrganismos marinhos e o uso de redes moleculares como ferramenta na busca por substâncias bioativas em cianobactérias marinhas do gênero *Symploca***. 2016. 152 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

O ambiente marinho apresenta uma rica biodiversidade e, por ser ainda pouco explorado configura-se como uma fonte potencial de novos organismos da flora e fauna marinhas, o que possibilita a descoberta de estruturas distintas e biologicamente ativas. Microrganismos marinhos como cianobactérias e fungos possuem um metabolismo secundário rico, o qual produz substâncias bioativas. Em virtude do exposto, um dos objetivos deste trabalho foi avaliar química e biologicamente as linhagens de cianobactérias marinhas *Cyanobium* sp. CENA178, *Cyanobium* sp. CENA181 e *Oxynema* sp. CENA135 provenientes de manguezais da Ilha do Cardoso, do Estado de São Paulo. Foram identificados os aminoácidos alanina, treonina e valina presentes na fração ACN:H₂O (40:60) da linhagem *Oxynema* sp. CENA135. Por meio das análises realizadas em CG-EM, a fração n-hexano/acetato de etila (9:1) da linhagem *Cyanobium* sp. CENA178 apresentou os componentes: 2,4-bis (1,1-dimetiletil) fenol, (*Z*)-7-hexadeceno 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona e eicosano; a fração n-hexano da linhagem *Cyanobium* sp. CENA181 apresentou como componente majoritário o neoftadieno, o qual também foi encontrado na fração acetato de etila da linhagem *Oxynema* sp. CENA135, juntamente com os componentes majoritários: heptadecano, [*R*-(*R*^{*},*R*^{*}-(*E*))]-3,7,11,15-tetrametil-2-hexadeceno e octadecino. Com relação à triagem biológica, as linhagens *Cyanobium* sp. CENA178 e *Cyanobium* sp. CENA181, apresentaram atividade anticolinesterásica moderada e fraca, respectivamente. Concomitantemente foi realizada uma co-cultura entre a linhagem de cianobactéria *Cyanobium* sp. CENA181 e o fungo endofítico marinho *Penicillium decaturense*, onde foi isolada do extrato bruto do fungo *P. decaturense* a substância 10,11-deidrocurvularina e como produto da co-cultura foi obtida a substância curvularina. Deste modo, foi demonstrado que houve interação química entre os microrganismos devido a produção de diferentes metabólitos secundários. Adicionalmente, foram investigadas nove linhagens de cianobactérias do gênero *Symploca* quanto à análise química e biológica, provenientes do Panamá, Samoa Americana e uma da coleção de cultura de Pasteur (PCC8002). Por meio da análise de redes moleculares (molecular networking) foram identificadas três substâncias conhecidas: apratoxina A; palmiramida A e curacina D. Das frações A2143 E e F foi isolada uma substância inédita denominada de caracolamida A. Da fração G foi isolada uma substância conhecida pertencente à classe dos polimetoxi-alquenos isotáticos denominada de 4,6,8,10,12,14,16,18,20,22-decametóxi-heptacos-1-eno. A substância inédita caracolamida A foi comparada com o padrão feniletilamina e ambas demonstraram ter atividade neuromoduladora em concentrações subnanomolares, possuindo efeitos similares na oscilação e frequência dos canais de Ca²⁺. Os resultados apresentados neste trabalho acrescentam dados químicos e biológicos às espécies estudadas e enriquecem a área de Produtos Naturais Marinhos.

Palavras-chave: Cianobactéria, *Cyanobium*; *Penicillium*; Co-cultura; *Symploca*; Rede molecular; Caracolamida A; Polimetóxi-1-alqueno isotático

ABSTRACT

ARMSTRONG, L. **Chemical and biological investigation of marine microorganisms, and the use of molecular networking as tool for searching bioactive compounds in marine cyanobacteria of the genus *Symploca***. 2016. 152 p. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

The marine environment contains a rich biodiversity and, since it is relatively underexplored, is a great source for finding new organisms including marine flora and fauna. This enables the discovery of chemicals with distinct structures and biological activity. Marine microorganisms, such as cyanobacteria and fungi, have rich secondary metabolism, which yield biologically active molecules. Accordingly, one aim of this work was to evaluate the chemical profiles and biological activities of the compounds isolated from marine cyanobacteria strains *Cyanobium* sp. CENA178, *Cyanobium* sp. CENA181 and *Oxynema* sp. CENA135 from Ilha do Cardoso mangrove, State of São Paulo. The results indicate that it would help to adopt different laboratory cultivation methods for growing cyanobacteria strains to mimic the natural habitat and increase the opportunity to obtain new secondary metabolites. Aminoacids alanine, threonine and valine were identified of the fraction ACN:H₂O (40:60) of the strain *Oxynema* sp. CENA135. Through the analyzes performed in CG-MS, the hexane/ethyl acetate (9:1) fraction of the strain *Cyanobium* sp. CENA178 showed the components: 2,4-bis (1,1-dimethylethyl) phenol, (*Z*)-7-hexadecene, 6,10,14-trimethyl-2-pentadecanone and eicosane. From the hexane fraction of *Cyanobium* sp. CENA181, neophytadiene was observed as the major component, and this was also found in the ethyl acetate fraction of *Oxynema* sp. CENA135 strain along with heptadecane, 2-hexadecene, 3,7,11,15-tetramethyl-, [*R**,*R**-(*E*)] and 1-octadecyne. *Cyanobium* sp. CENA178 and *Cyanobium* sp. CENA181 showed moderate and weak anticholinesterase activity, respectively. Simultaneously, a co-culture was performed using *Cyanobium* sp. CENA181 and the marine endophytic fungus, *Penicillium decaturense*. The compound 10,11-dehydrocurvularin was isolated from the crude extract of *P. decaturense*, and curvularin from only the co-culture. Therefore, it was clear that the microorganisms exhibited an interaction leading to the different production of secondary metabolites. Nine species of cyanobacteria of the genus *Symploca* from Panama, American Samoa and one from Pasteur culture collection (PCC8002) were investigated to yield new natural products. Through molecular networking analysis three known compounds were identified: apratoxin A; palmiramide A and curacin D. Caracolamide A is a new compound isolated from fractions A2143 E and F. A known compound isolated from the same organism is called 4,6,8,10,12,14,16,18,20,22-decamethoxyheptacos-1-ene, and it is an isotactic polymethoxy-1-alkene. The new compound caracolamide A demonstrated neuromodulatory activity at subnanomolar concentrations, and displayed similar effects as a phenylethylamine standard on the oscillation amplitude and frequency in Ca²⁺ channels. The results presented in this work provide chemical and biological information about the species studied, and enrich marine natural products research.

Keywords: Cyanobacteria, *Cyanobium*; *Penicillium*; Co-culture; *Symploca*; Molecular networking; Caracolamide A; Isotactic polymethoxy-1-alkene

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	A. Fonte original de produtos naturais marinhos com agentes terapêuticos atualmente aprovados ou em ensaios pré-clínicos (20). B. Microrganismos potencialmente produtores dos fármacos aprovados através da previsão da rota biossintética. (Gráfico adaptado, Fonte: GERWICK; MOORE, 2012).....	3
Figura 2.	Substâncias de origem marinha comercializadas atualmente.....	5
Figura 3.	Toxinas encontradas em cianobactérias.....	8
Figura 4.	Substâncias isoladas de cianobactérias marinhas das espécies <i>Schizothrix</i> sp. (4), <i>Moorea producens</i> (5) e <i>Moorea bouillonii</i> (6).....	10
Figura 5.	Substâncias isoladas de cianobactérias marinhas com potencial anticancerígeno.....	11
Figura 6.	Substância isolada da linhagem <i>Cyanobium</i> sp. LEGE 06113.....	13
Figura 7.	Culturas de cianobactérias coletadas na Ilha do Cardoso-SP, pertencentes às ordens Chroococcales e Oscillatoriales mantidas no Laboratório de Química Orgânica do Ambiente Marinho -NPPNS, FCFRP-USP.....	17
Figura 8.	Culturas de cianobactérias coletadas e isoladas da Ilha do Cardoso mantidas no Laboratório de Química Orgânica do Ambiente Marinho – FCFRP-USP. A- <i>Cyanobium</i> sp. CENA178; B- <i>Cyanobium</i> sp. CENA181; C- <i>Oxynema</i> sp. CENA135. (Créditos das Fotomicrografias: Diego Bonaldo Genuário – CENA-USP).....	17
Figura 9.	Fluxograma do isolamento e purificação da substância CENA178_2M a partir do extrato bruto de <i>Cyanobium</i> sp. CENA178.....	20
Figura 10.	Fluxograma do isolamento e purificação da substância CENA181_H1 a partir do extrato bruto de <i>Cyanobium</i> sp. CENA181.....	21
Figura 11.	Fluxograma do isolamento e purificação das substâncias CENA 135_A1_3a, CENA 135_A1_3b, CENA135_A1_3_2 a partir do extrato bruto de <i>Oxynema</i> sp. CENA135.....	22
Figura 12.	Cromatogramas obtidos via análise em CLAE-DAD. A: Frações H+I de <i>Cyanobium</i> sp. CENA178, λ = 190 nm; B. Fração H+I de <i>Cyanobium</i> sp. CENA181, λ = 224 nm; C. Subfração CENA135_A_1 de <i>Oxynema</i> sp. CENA135, λ = 238 nm.....	27
Figura 13.	Cromatograma da subfração CENA135_A_1 de <i>Oxynema</i> sp. CENA135, Fase móvel: MeOH:H ₂ O (ácido formico 0,1%). Gradiente: 0-30 min (2 a 100% de MeOH) e 30-35 min (100% de	

	MeOH) (v/v), $\lambda = 238$ nm.....	28
Figura 14.	Espectro de absorção na região do Infravermelho da substância CENA135_A1_3b.....	29
Figura 15.	Porções do composto relacionadas aos aminoácidos alanina, treonina e valina de acordo com os espectros de 1-D e 2-D.....	30
Figura 16.	Estruturas das frações de baixa polaridade analisadas em CG-EM encontradas nas linhagens <i>Cyanobium</i> sp. CENA178, <i>Cyanobium</i> sp. CENA181 e <i>Oxynema</i> sp. CENA135.....	34
Figura 17.	Substâncias bioativas derivadas de fungos marinhos.....	38
Figura 18.	Substâncias bioativas isoladas do gênero <i>Penicillium</i>	39
Figura 19.	Substâncias com atividade antitumoral e antibacteriana.....	40
Figura 20.	Substâncias isoladas do gênero <i>Penicillium</i> ativas contra bactérias.....	40
Figura 21.	Substâncias com atividade antimicrobiana e citotóxica isoladas de co-cultura entre microrganismos.....	41
Figura 22.	Co-cultura de <i>Cyanobium</i> sp. CENA181 e fungo <i>Penicillium decaturense</i> , em meio SWBG-11 (A) e PDB (B), no período de 21 dias. Fonte: o Autor).....	46
Figura 23.	Cromatogramas obtidos da análise em CLAE-DAD em meio SWBG-11. A: Cultivo de sete dias. Linha verde: fungo <i>Penicillium decaturense</i> ; Linha azul: linhagem <i>Cyanobium</i> sp. CENA181; Linha rosa: co-cultura entre ambos os microrganismos. B: Cultivo de 21 dias. Linha azul: fungo <i>Penicillium decaturense</i> ; Linha vermelha: linhagem <i>Cyanobium</i> sp. CENA181; Linha preta: co-cultura. UV= 208 nm.....	48
Figura 24.	Cromatogramas obtidos da análise em CLAE-DAD em meio PDB. A: Cultivo de sete dias. Linha vermelha: fungo <i>Penicillium decaturense</i> ; Linha verde: linhagem <i>Cyanobium</i> sp. CENA181; Linha azul: co-cultura entre ambos os microrganismos; Linha preta: meio controle PDB. B: Cultivo de 21 dias. Linha azul: fungo <i>Penicillium decaturense</i> ; Linha rosa: linhagem <i>Cyanobium</i> sp. CENA181; Linha preta: co-cultura. UV= 254 nm. As setas pretas indicam as substâncias observadas somente na co-cultura.....	49
Figura 25.	Cromatogramas obtidos da análise em CLAE-DAD em meio PDB, análise semi-preparativa. A: Extrato bruto do fungo <i>Penicillium decaturense</i> . B: Extrato bruto do co-cultivo do fungo <i>Penicillium decaturense</i> e da linhagem <i>Cyanobium</i> sp.	

	CENA181. UV= 281 nm.....	51
Figura 26.	Cromatograma da substância LAT67_7. Fase móvel: ACN e H ₂ O. Gradiente: 0-40 min (3 a 80% de ACN); 40-50 min (100% de ACN); 50-55 min (80% de ACN); 55-60 min (3% de H ₂ O) (v/v). Vazão: 1,0 mL/min. UV= 254 nm.....	52
Figura 27.	Estrutura da substância 10,11- deidrocurvularina e as correlações observadas no mapa de contorno HMBC.....	53
Figura 28.	Cromatograma da substância LACCP_8. Fase móvel: ACN e H ₂ O. Gradiente: 0-40 min (3 a 80% de ACN); 40-50 min (100% de ACN); 50-55 min (80% de ACN); 55-60 min (3% de H ₂ O) (v/v). Vazão: 1,0 mL/min. UV= 254 nm.....	55
Figura 29.	Estrutura da substância curvularina e as correlações dos espectros de 2-D.....	56
Figura 30.	Esquema representando a rede molecular através de espectros EM/EM, aplicação das fórmulas matemáticas e conversão dos textos em atributos até a geração da rede molecular.....	63
Figura 31.	Substâncias isoladas do gênero <i>Symploca</i> com atividade antitumoral.....	65
Figura 32.	Substâncias cloradas encontradas em cianobactérias marinhas.....	67
Figura 33.	Linhagem de cianobactéria <i>Symploca</i> sp. A2234 coletada em Samoa Americana. A: amostra ambiental coletada durante um mergulho; B. Análise microscópica (Créditos das fotos: Laboratório do Prof. Dr. William Gerwick).....	70
Figura 34.	Fluxograma de fracionamento de extratos brutos utilizando gradiente de solventes.....	71
Figura 35.	Fluxograma da extração e obtenção das substâncias isoladas da linhagem <i>Symploca</i> sp. 2143.....	74
Figura 36.	Rede molecular (molecular networking) do extrato bruto e frações (A- I) de linhagens do gênero <i>Symploca</i> (A2133, A2136, A2141, A2143, A2148, A2149, A2228, A2234, PCC8002) provenientes do Panamá, Samoa Americana e da coleção de cultura de cianobactérias de Pasteur.....	80
Figura 37.	Estrutura da substância 4,6,8,10,12,14,16,18,20,22-decametóxi-heptacos-1-eno.....	85
Figura 38.	Espectro de absorção na região do Infravermelho da substância caracolamida A, MeOH.....	88

Figura 39.	Estrutura parcial da substância caracolamida A (a e b) conectados por HMBC (flechas).....	89
Figura 40.	Correlações de COSY e HMBC da substância caracolamida A....	89
Figura 41.	Estrutura da substância inédita caracolamide A.....	90
Figura 42.	Grupo de substâncias observado na rede molecular pertencente à substância inédita caracolamida A, m/z 315,048.....	91
Figura 43.	Substâncias com grupos químicos semelhantes a substância inédita caracolamida A.....	92
Figura 44.	Tetrodotoxina (1 μ M), controle negativo. B-G: Representação da relação da resposta entre tempo e concentração para mudanças em oscilações de Ca^{2+} em neurônios neocorticais induzidas por caracolamida A. H: Veratridina (30 μ M), controle positivo. Dados representativos de 2 experimentos em 10 replicatas por dose de experimento.....	95
Figura 45.	A: Tetrodotoxina (1 μ M), controle negativo. B-G: Representação da relação da resposta entre tempo e concentração para mudanças em oscilações de Ca^{2+} em neurônios neocorticais induzidas por caracolamida A. H: veratridina (30 μ M), controle positivo. Dados representativos de 2 experimentos em 5 replicatas por dose de experimento.....	95
Figura 46.	A: Tetrodotoxina (1 μ M), controle negativo. B-G: Representação da relação da resposta entre tempo e concentração para mudanças em oscilações de Ca^{2+} em neurônios neocorticais induzidas pelo padrão feniletilamina. H: Veratridina (30 μ M), controle positivo. Dados representativos de 2 experimentos em 5 replicatas por dose de experimento.....	96
Figura 47.	Espectro de RMN de 1H da substância CENA135_A1_3a, CD_3OD+D_2O , 500 MHz.....	113
Figura 48.	Espectro de RMN de 1H da substância CENA135_A1_3b, CD_3OD+D_2O , 600 MHz.....	114
Figura 49.	Mapa de contorno COSY da substância CENA135_A1_3b, CD_3OD+D_2O , 600 MHz.....	115
Figura 50.	Mapa de contorno HMQC da substância CENA135_A1_3b, CD_3OD+D_2O , 600.....	116
Figura 51.	Mapa de contorno HMBC da substância CENA135_A1_3b, CD_3OD+D_2O , 600 MH.....	117
Figura 52.	Espectro de RMN de 1H da substância CENA135_A1_3_2,	

	CD ₃ OD+D ₂ O, 500 MHz.....	118
Figura 53.	Mapa de contorno COSY da substância CENA135_A1_3_2, CD ₃ OD+D ₂ O, 500 MHz.....	119
Figura 54.	Mapa de contorno HMQC da substância CENA135_A1_3_2, CD ₃ OD+D ₂ O, 500 MHz.....	120
Figura 55.	Mapa de contorno HMBC da substância CENA135_A1_3_2, CD ₃ OD+D ₂ O, 500 MHz	121
Figura 56.	<i>Screening</i> do extrato bruto do fungo <i>P. decaturense</i> (A) e do extrato bruto da co-cultura do fungo <i>P. decaturense</i> e da linhagem de cianobactéria <i>Cyanobium</i> sp. CENA181 (B), modo positivo.....	122
Figura 57.	<i>Screening</i> do extrato bruto do fungo <i>P. decaturense</i> (A) e do extrato bruto da co-cultura do fungo <i>P. decaturense</i> e da linhagem de cianobactéria <i>Cyanobium</i> sp. CENA181 (B), modo negativo.....	123
Figura 58.	Espectro de RMN de ¹ H da substância 10,11-deidrocurvularina, CD ₃ OD, 500 MHz.....	124
Figura 59.	Espectro de RMN de ¹ H ampliado da substância 10,11-deidrocurvularina, CD ₃ OD, 500 MHz.....	125
Figura 60.	Mapa de contorno COSY da substância 10,11-deidrocurvularina, CD ₃ OD, 500 MHz	126
Figura 61.	Mapa de contorno HMQC da substância 10,11-deidrocurvularina, CD ₃ OD, 500 MHz.....	127
Figura 62.	Mapa de contorno HMBC da substância 10,11-deidrocurvularina, CD ₃ OD, 500 MHz.....	128
Figura 63.	EM em alta resolução, obtido para substância 10,11-deidrocurvularina a partir da do fungo <i>Penicillium decaturense</i> , modo positivo, <i>m/z</i> 291,1201.....	129
Figura 64.	EM em alta resolução, obtido para substância 10,11-deidrocurvularina a partir da do fungo <i>Penicillium decaturense</i> , modo negativo, <i>m/z</i> 289,1113.....	130
Figura 65.	Espectro de RMN de ¹ H da substância curvularina, CD ₃ OD, 500MHz.....	131
Figura 66.	Espectro de RMN de ¹ H ampliado da substância curvularina, CD ₃ OD, 500 MHz.....	132

Figura 67.	Mapa de contorno COSY da substância curvularina, CD ₃ OD, 500 MHz.....	133
Figura 68.	Mapa de contorno HMQC da substância curvularina, CD ₃ OD, 500 MHz.....	134
Figura 69.	Mapa de contorno HMBC da substância curvularina, CD ₃ OD, 500 MHz.....	135
Figura 70.	Espectros de massas em alta resolução a partir do extrato bruto da co-cultura entre o fungo <i>P. decaturense</i> e a linhagem de cianobactéria <i>Cyanobium</i> sp. CENA181; m/z 315,1171 [M+Na] ⁺ , modo positivo.....	136
Figura 71.	Espectros de massas em alta resolução a partir do extrato bruto da co-cultura entre o fungo <i>P. decaturense</i> e a linhagem de cianobactéria <i>Cyanobium</i> sp. CENA181; m/z 291,1185 [M-H] ⁻ , modo negativo.....	137
Figura 72.	Espectro do íon molecular (m/z 840,35) do padrão da substância apratoxina A (A); seus padrões de fragmentação (B) comparação com o íon molecular (m/z 840,74) encontrado na fração 2141H (C) e seus padrões de fragmentação comparados com a substância padrão (D).....	138
Figura 73.	Espectro do íon molecular (m/z 672,14) do padrão da substância palmiramida A (A); seus padrões de fragmentação (B) e comparação com o íon molecular (m/z 672,15) encontrado na fração 2228E (C) e seus padrões de fragmentação comparados com a substância padrão (D).....	139
Figura 74.	Espectro do íon molecular (m/z 360,07) do padrão da substância curacina D (A); seus padrões de fragmentação (B) e comparação com o íon molecular (m/z 360,28) encontrado na fração 2136C (C) e seus padrões de fragmentação (D); íon molecular (m/z 360,07) encontrado na fração 2136D (E) e padrões de fragmentação (F).....	140
Figura 75.	Íon molecular (m/z 360,31) encontrado na fração 2141C (A) e seus padrões de fragmentação (B); íon molecular (m/z 360,30) encontrado na fração 2143C (C) e seus padrões de fragmentação (D); íon molecular (m/z 360,49) encontrado na fração 2143F (E) e padrões de fragmentação (F) comparados com o padrão curacina D, exibido na Figura 62.....	141
Figura 76.	Espectro de RMN de ¹ H da substância 4,6,8,10,12,14,16,18,20,22-decimetóxi-heptacos-1-eno, C ₆ D ₆ , 500 MHz.....	142
Figura 77.	Espectro ampliado de RMN de ¹ H da substância	

	4,6,8,10,12,14,16,18,20,22-decametóxi-heptacos-1-eno, C_6D_6 , 500.....	143
Figura 78.	Espectro de RMN de ^{13}C da substância 4,6,8,10,12,14,16,18,20,22-decametóxi-heptacos-1-eno, C_6D_6 , 125 MHz.....	144
Figura 79.	EM de alta resolução de 4,6,8,10,12,14,16,18,20,22-decametóxi-heptacos-1-eno, m/z 679,53890 $[M + H]^+$	145
Figura 80.	Espectro de RMN de 1H da substância caracolamida A, CD_3OD , 600 MHz.....	146
Figura 81.	Espectro ampliado de RMN de 1H da substância caracolamida A, CD_3OD , 600 MHz.....	147
Figura 82.	Espectro de RMN de ^{13}C da substância caracolamida A, CD_3OD , 125 MHz.....	148
Figura 83.	Mapa de contorno COSY da substância caracolamida A, CD_3OD	149
Figura 84.	Mapa de contorno HSQC da substância caracolamida A, CD_3OD	150
Figura 85.	Mapa de contorno HMBC da substância caracolamida A, CD_3OD	151
Figura 86.	EM em alta resolução, obtido para amostra caracolamida A a partir da linhagem <i>Symploca</i> sp., (B) modo positivo, m/z 336, 08983 $[M + Na]^+$	152

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Componentes do meio SWBG-11 (A) e ASNIII (B).....	15
Tabela 2	Linhagens de cianobactérias isoladas de manguezais do Estado de São Paulo.....	17
Tabela 3	Rendimentos obtidos dos cultivos de cianobactérias das linhagens <i>Cyanobium</i> sp. CENA178, <i>Cyanobium</i> sp. CENA181 e <i>Oxynema</i> sp. CENA135.....	19
Tabela 4	Programação de temperatura do CG-EM durante a análise das frações.....	24
Tabela 5	Principais substâncias encontradas nas frações de baixa polaridade analisadas via CG-EM, com similaridade maior que 90% com banco de dados do equipamento.....	32
Tabela 6	Rendimento dos extratos brutos obtidos de cultura isolada e cultura mista da linhagem <i>Cyanobium</i> sp. CENA181 e do fungo <i>Penicillium decaturense</i> , em meio SWBG-11.....	46
Tabela 7	Rendimento dos extratos brutos obtidos de cultura isolada e cultura mista da linhagem <i>Cyanobium</i> sp. CENA181 e do fungo <i>Penicillium decaturense</i> , em meio PDB.....	47
Tabela 8	Perfil químico geral dos valores de massas (m/z) encontrados no extrato bruto do fungo <i>Penicillium decaturense</i> e da co-cultura de <i>P. decaturense</i> e da linhagem <i>Cyanobium</i> sp. CENA181, em meio PDB.....	50
Tabela 9	Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C de 10,11-deidrocurvularina, em CD ₃ OD, comparados com dados da literatura.....	54
Tabela 10	Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da substância curvularina, em CD ₃ OD, comparados com dados da literatura.....	57
Tabela 11	Linhagens do gênero <i>Symploca</i> provenientes de Samoa Americana, Panamá e coleção de cultura de Pasteur (PCC8002).....	70
Tabela 12	Linhagens do gênero <i>Symploca</i> da coleção do laboratório do Prof. Dr. William Gerwick provenientes do Panamá e Samoa Americana....	84
Tabela 13	Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C de 4,6,8,10,12,14,16,18,20,22-decimetóxi-heptacos-1-eno, em C ₆ D ₆ , comparados com dados da literatura.....	86
Tabela 14	Dados de RMN 1-D e 2-D para Caracolamide A em CD ₃ OD.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	micrograma
µL	microlitro
mL	mililitro
Ca ²⁺	cálcio
CLAE-DAD	cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detector de arranjo de diodo
CLAE-EM	cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometro de massas
CCDC	cromatografia em camada celgada comparativa
CG-EM	cromatografia gasosa acoplada à espectrometro de massas
CLV	cromatografia líquida à vácuo
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
EM/EM	Fragmentação em espectrometria de massas
h	hora
HDAC	Histona deacetilase
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
IV	infravermelho
<i>m/z</i>	massa/carga
MeOH	metanol
min	minuto
ppm	partes por milhão
R _f	fator de retenção

RMN	ressonância magnética nuclear
TMS	trimetilsilano
t_R	tempo de retenção
UV	ultravioleta

SUMÁRIO

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Lista de figuras.....	iii
Lista de tabelas.....	x
Lista de abreviaturas e siglas.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Produtos Naturais Marinhos.....	1
1.2 Microrganismos marinhos.....	3
1.3 Potencial biológico e farmacológico de produtos naturais marinhos.....	4
1.4 Apresentação do trabalho.....	6
2. Capítulo I- Prospecção química e biológica de cianobactérias provenientes de manguezais.....	7
2.1 INTRODUÇÃO.....	7
2.1.1 Cianobactérias.....	7
2.1.2 Manguezais.....	11
2.1.3 Gênero <i>Cyanobium</i>	12
2.1.4 Gênero <i>Oxynema</i>	13
2.2 OBJETIVOS.....	13
2.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
2.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
2.3.1 Material e equipamentos utilizados.....	14
2.4 Coleta, isolamento e identificação taxonômica das linhagens de cianobactérias.....	16
2.4.1 Coleta.....	16
2.4.2 Isolamento e identificação taxonômica.....	18
2.5 Extração, fracionamento e triagem química preliminar dos metabólitos.....	18

2.5.1 Extração e fracionamento.....	18
2.5.2 Triagem química preliminar.....	19
2.6 Isolamento, purificação dos compostos isolados e avaliação das atividades biológicas dos extratos e frações.....	20
2.6.1 Análise de cianotoxinas por CLAE-EM.....	23
2.6.2 Análises em CG-EM.....	23
2.7 Avaliação das atividades biológicas dos extratos e frações.....	24
2.7.1 Avaliação da atividade antibacteriana.....	24
2.7.2 Avaliação da atividade antifúngica.....	25
2.7.3 Avaliação da atividade antifúngica frente a fungos fitopatogênicos....	25
2.7.4 Avaliação da atividade anticolinesterásica.....	26
2.8 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
2.8.1 Triagem química preliminar.....	27
2.8.2 Isolamento, purificação e avaliação das atividades biológicas dos compostos obtidos.....	27
2.8.3 <i>Cyanobium</i> sp. CENA178 e <i>Cyanobium</i> sp. CENA181.....	28
2.8.4 <i>Oxyteta</i> sp. CENA135.....	28
2.8.5 Análise de cianotoxinas e cianopeptídeos por CLAE-EM.....	31
2.8.6 Análises em CG-EM.....	31
2.9 Avaliação das atividades biológicas dos extratos e frações.....	34
2.9.1 Avaliação da Atividade Antibacteriana.....	34
2.9.2 Avaliação da Atividade Antifúngica.....	35
2.9.3 Avaliação da Atividade Antifúngica contra fungos fitopatogênicos.....	35
2.9.4 Avaliação da Atividade Anticolinesterásica.....	35
2.10 CONCLUSÕES.....	36
3. Capítulo II- Avaliação da interação química entre a linhagem de cianobactéria <i>Cyanobium</i> sp. CENA181 com o fungo endofítico marinho <i>Penicillium decaturense</i> por meio de co-cultura.....	37
3.1 INTRODUÇÃO.....	37
3.1.2 Fungos marinhos.....	37
3.1.3 O gênero <i>Penicillium</i> e seus metabólitos secundários bioativos.....	38

3.1.4 Co-cultura entre cianobactéria e fungo.....	41
3.2 OBJETIVOS.....	43
3.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
3.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.3.1 Material e equipamentos utilizados.....	43
3.3.2 Obtenção da cultura do fungo <i>Penicillium decaturense</i>	44
3.3.3 Co-cultura da linhagem de cianobactéria <i>Cyanobium</i> sp. CENA181 e do fungo endofítico de alga marinha <i>Penicillium decaturense</i>	45
3.3.4 Extração e isolamento dos extratos brutos obtidos da co-cultura da linhagem de cianobactéria <i>Cyanobium</i> sp. CENA181 e do fungo endofítico de alga marinha <i>Penicillium decaturense</i>	46
3.4 RESULTADOS.....	48
3.4.1 Avaliação do perfil químico dos extratos brutos do fungo <i>Penicillium decaturense</i> , da linhagem <i>Cyanobium</i> sp. CENA181 e da co-cultura de cianobactéria <i>Cyanobium</i> sp. CENA181 e fungo <i>Penicillium decaturense</i> em meio SWBG-11 e PDB.....	48
3.4.2 Obtenção da substância do extrato bruto do fungo LAT67_7 e da substância do extrato bruto do co-cultivo LACCP_8.....	51
3.4.2.1 Determinação da substância 10,11 deidrocurvularina.....	52
3.4.2.2 Determinação da substância curvularina.....	55
3.5 CONCLUSÕES.....	61
4. Capítulo III- Uso de redes moleculares (molecular networking) na busca de substâncias bioativas inéditas em espécies do gênero <i>Symploca</i>	62
4.1 INTRODUÇÃO.....	62
4.1.2 Uso de redes moleculares (molecular networking) na investigação de produtos naturais.....	62
4.1.3 O gênero <i>Symploca</i> e suas substâncias bioativas.....	64
4.1.4 Substâncias cloradas provenientes de cianobactérias marinhas.....	66
4.2 OBJETIVOS.....	67
4.2.1 OBJETIVO GERAL.....	67
4.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	68
4.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	68
4.3.1 Coleção de culturas de cianobactérias marinhas.....	68

4.3.2 Extração e fracionamento dos extratos.....	69
4.4 Triagem química e biológica dos extratos brutos e frações.....	71
4.4.1 Triagem química.....	71
4.4.2 Obtenção da rede molecular.....	71
4.4.3 Avaliação das atividades biológicas dos extratos brutos e frações.....	72
4.4.3.1 Avaliação das atividades antiparasitárias e de citotoxicidade.....	72
4.5 Isolamento e identificação de substâncias da linhagem <i>Symploca</i> A2143.....	74
4.5.1 Obtenção das substâncias LA2143G1.2.2 e de LA2143EF3.....	74
4.6 Avaliação das atividades biológicas das substâncias isoladas 4,6,8,10,12,14,16,18,20,22-decametóxi-heptacos-1-eno e de caracolamida A.....	75
4.6.1 Avaliação da atividade antiparasitária.....	75
4.6.2 Ensaio citotóxico em linhagens H460.....	76
4.6.3 Monitoramento intracelular dos canais de Ca ²⁺ em neurônios.....	77
4.7 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	79
4.7.1 Uso de rede molecular (molecular networking) como ferramenta na identificação de substâncias químicas.....	79
4.8 Avaliação das atividades biológicas.....	83
4.8.1 Avaliação das atividades antiparasitárias e de citotoxicidade.....	83
4.9 Isolamento e identificação de substâncias.....	85
4.9.1 Determinação da substância 4,6,8,10,12,14,16,18,20,22-decametóxi-heptacos-1-eno.....	85
4.9.2 Isolamento da substância inédita caracolamida A.....	87
4.10 Avaliação das atividades biológicas das substâncias isoladas 4,6,8,10,12,14,16,18,20,22-decametóxi-heptacos-1-eno e de caracolamida A.....	92
4.10.1 Avaliação das atividades antiparasitárias.....	92
4.10.2 Ensaio citotóxico em linhagens H460.....	93
4.10.3 Monitoramento intracelular dos canais de Ca ²⁺ em neurônios.....	93
4.11 CONCLUSÕES.....	97

5.REFERÊNCIAS.....	99
6 ANEXOS (ANEXO A).....	113

1-INTRODUÇÃO

1.1 Produtos Naturais Marinhos

Os oceanos comportam uma rica biodiversidade do planeta, por serem ainda pouco explorados se tornam uma potencial fonte de descoberta de novos organismos da flora e fauna marinhas. Taxonomicamente, dos mais de 76 filos entre os eucariotos, reconhecidos no Catálogo da vida (Catalogue of life), 60 pertencem ao ambiente marinho (BLUNT; BUCKINGHAM; MUNRO, 2012). Atualmente, estão registradas no “Registro Mundial de Espécies Marinhas” (World Register of Marine Species (WoRMS)) 242.745 espécies aceitas (WORMS, 2016).

Devido a essa diversidade o ambiente marinho tem despertado há décadas o interesse de pesquisadores e é considerado uma fonte potencial de descoberta de novas espécies e substâncias com estruturas distintas e biologicamente ativas. Muitas destas, deram origem a fármacos que atualmente estão disponíveis no mercado e serão citados mais adiante (BHAKUNI; RAWAT, 2005; GERWICK; MOORE, 2012; GERWICK, FENNER, 2013; NEWMAN, CRAG, 2016).

A primeira publicação sobre a composição química de um organismo marinho ocorreu em esponjas no ano de 1933 por Bergman. Ao longo dos anos, o estudo de produtos naturais marinhos têm-se aprimorado com estudos taxonômicos, biomoleculares, novas técnicas de isolamento e identificação de substâncias, além das mais variadas atividades biológicas, como antiviral, anticâncer, antiparasitária, antimicrobiana, etc. (BLUNT; BUCKINGHAM; MUNRO, 2012; GERWICK; MOORE, 2012; GERWICK, FENNER, 2013; BLUNT et al., 2015).

O grande desenvolvimento dos Produtos Naturais Marinhos (PNM) deu-se nos últimos 20 anos através da descoberta da importância de organismos vivendo em associações e de derivados de microrganismos marinhos (BLUNT; BUCKINGHAM; MUNRO, 2012).

Inicialmente os estudos eram realizados em esponjas, corais e algas vermelhas devido ao fácil acesso a estes organismos. A partir destas foi revelada uma gama de compostos inéditos e altamente halogenados, devido a disponibilidade de íons como bromo, cloro e iodo na água do mar, levando a amplitude de estudos em organismos marinhos em busca de novos agentes químicos (CABRITA; VALE; RAUTER, 2010; CHOI et al, 2012; GERWICK, MOORE, 2012).

Tempos depois com a possibilidade de realizações de mergulhos, a exploração de organismos antes inacessíveis tornou-se possível e, assim, puderam ser estudados fungos, cianobactérias e bactérias marinhas, despontando como novas fontes de metabólitos secundários. Dessa forma, muitas substâncias novas foram isoladas e outras re-isoladas de microrganismos, as quais antes eram relatadas como oriundas de invertebrados marinhos, destacando-se novamente a importância da associação entre eles (GERWICK, MOORE, 2012).

Um levantamento anual realizado por pesquisadores da Nova Zelândia sobre a descoberta de novos PNM tem registrado um número significativo de novas substâncias descobertas. No ano de 2011 foram descritas 1.152, no ano de 2012, 1.241, no ano de 2013, 1.163 e no ano de 2014, 1.378. Números significativamente relevantes quando comparados com a primeira publicação ocorrida em 1984 que apontava 384 novas substâncias (BLUNT et al., 2013; BLUNT et al., 2014; BLUNT et al., 2015; BLUNT et al., 2016).

No Brasil, estudos com organismos marinhos iniciaram-se na década de 60 por Bernard Tursch e a primeira substância a ser isolada foi o colesterol, proveniente de um ouriço-do-mar, os estudos prosseguiram-se com algas marinhas e invertebrados marinhos. A partir do ano de 1999 foram iniciados estudos com microrganismos de origem marinha (BERLINK et al.; 2004).

Estudos empregando organismos marinhos brasileiros têm revelado uma diversificada classe de compostos químicos como alcaloides, peptídeos e policetídeos, os quais exibiram atividades anticancerígenas interessantes (IÓCA; ALLARD; BERLINCK, 2014). Substâncias identificadas e atividades biológicas de organismos marinhos brasileiros são também reportadas nos artigos revisados anualmente pelos pesquisadores Blunt et al. (2013, 2014, 2015, 2016).

Uma breve história dos PNM mostra apenas uma pequena parte da sua real importância para as mais variadas vertentes de linhas de pesquisa. Destacada ao longo dos anos por diversos pesquisadores como um ambiente pouco explorado com uma fonte rica de produtos inéditos e bioativos com grande potencial terapêutico, os estudos publicados ao longo dos anos reforçam essa idéia e dão impulso para novas descobertas.

Considerada no Brasil uma área recente e pouco explorada ao longo da costa, destaca-se a importância do estudo dos organismos marinhos para enriquecimento da flora e fauna do país.

1.2 Microrganismos marinhos

O estudo de microrganismos marinhos teve seu ápice com William Fenical aproximadamente há 20 anos atrás, e desde então, continuam a ser arduamente investigados (BLUNT; BUCKINGHAM; MUNRO, 2012).

Microrganismos marinhos como bactérias, cianobactérias, actinomicetos, microalgas e outros possuem um metabolismo secundário rico e alguns deles vêm sendo apontados como os reais produtores de substâncias antes identificadas a partir de moluscos, esponjas e tunicados. Somente as bactérias e cianobactérias são responsáveis por 80% do total dos ensaios clínicos e agentes farmacêuticos aprovados, Figura 1 (GERWICK; MOORE, 2012; GERWICK; FENNER, 2013).

Figura 1. A. Fonte original de produtos naturais marinhos com agentes terapêuticos atualmente aprovados ou em ensaios pré-clínicos (20). **B.** Microrganismos potencialmente produtores dos fármacos aprovados através da previsão da rota biossintética. (Gráfico adaptado, Fonte: GERWICK; MOORE, 2012)

Para descobrir como esses microrganismos produzem seus compostos muitos grupos de pesquisa tem estudado suas vias biossintéticas e programas de bioinformática vêm sendo desenvolvidos e utilizados para facilitar este estudo. Estes programas permitem identificar os grupos de genes produtores de metabólitos secundários, após isto estes genes são sintetizados e introduzidos em hospedeiros de expressão (GERWICK; MOORE, 2012; GERWICK; FENNER, 2013).

Dessa forma, através do entendimento das vias biossintéticas dos microrganismos e dos mecanismos de manipulação de genes para a obtenção de substâncias e análogas destas, espera-se chegar a interessantes substâncias com potencial valor farmacoterapêutico (GERWICK; MOORE, 2012; GERWICK; FENNER, 2013).

Considerados uma preciosidade do ambiente marinho, os microrganismos vêm apresentando inúmeras atividades biológicas como antiviral, antibacteriana, analgésica, anticolinesterásica, neurotóxica e principalmente anticâncer, sendo esta financiada pelo Instituto Nacional do Câncer do governo americano (CRAGG; NEWMAN, 2009; GERWICK; MOORE, 2012; GERWICK; FENNER, 2013; TADESSE et al., 2014; BLUNT et al., 2015; BLUNT et al., 2016).

Ao longo dos anos é vista como uma tendência a pesquisa em microrganismos marinhos e estudos recentes vêm demonstrando o surgimento de novas substâncias isoladas e ativas em bioensaios relevantes (BLUNT et al., 2016).

Como exemplo de novas substâncias bioativas podem ser citadas as mangromicinas A e B isoladas do actinomiceto *Lechevalieria aerocolonigenes* com atividade antitripanomicida (NAKASHIMA et al., 2014; BLUNT et al., 2016), a substância bastimolida A, um novo macrolídeo que possui uma forte atividade antimalária e foi isolado da cianobactéria marinha *Okeania hirsuta*, identificada como um novo gênero (SHAO et al., 2015). Do fungo marinho *Aspergillus* sp. XS-20090B15 foi isolado um agente antiviral, 22-O-(N-Me-L-valil)-21-epi-aflaquinolona B (CHEN et al. 2014; BLUNT et al., 2016).

Em virtude do que foi mencionado, a microbiota marinha mostra-se como uma fonte biodiversa e rica de novos produtos naturais, tornando-se um incentivo para novos estudos da área.

1.3 Potencial biológico e farmacológico de produtos naturais marinhos

Os produtos naturais marinhos vêm sendo alvos de investigação na busca de princípios ativos inéditos e eficazes para produção de novos fármacos. A aprovação do primeiro fármaco para comercialização ocorreu no ano de 2004 e foi isolado de um caracol marinho, seu componente químico é denominado ω -conotoxina MVIIA e seu nome comercial Prialt[®], sendo utilizado no tratamento da dor severa (BLUNT; MUNRO; UPJOHN, 2012).

Os esforços continuaram e anos depois novos fármacos foram aprovados comercialmente, dentre eles os derivados sintéticos de produtos naturais marinhos, como a vidarabina (**1**) (Vira-A[®]), citarabina (**2**) (Cytosar-U[®]), citarabina (Depocyt[®]) e mesilato de eribulina (**3**) (Halaven[®]) que podem ser vistos na Figura 2 (GERWICK, et al., 2008; GERWICK; FENNER, 2013).

Além das substâncias citadas anteriormente outras já estão sendo comercializadas, como trabectedina (**4**) (Yondelis®), um medicamento antitumoral que tem sua fonte em tunicados e o regulador da hipertrigliceridemia, ésteres do Ômega-3 (**5**) (Lovaza®), proveniente de óleo de peixes, cujas estruturas são apresentadas na Figura 2 (MAYER et al., 2010; GERWICK; MOORE, 2012; GERWICK; FENNER, 2013; DAVID; WOLFENDER; DIAS, 2015).

Os dados mais recentes sobre números de substâncias já isoladas do ambiente marinho indicam que mais de 22 mil novas substâncias já foram isoladas, correspondendo a menos de 2% da biodiversidade marinha total e são registradas no banco de dados DNMP (Dicionário de Produtos Naturais Marinhos) cerca de 30 mil substâncias (BLUNT; MUNRO; UPJOHN, 2012; GERWICK, 2012; GERWICK; FENNER, 2013).

Figura 2. Substâncias de origem marinha comercializadas atualmente

Como citado anteriormente, medicamentos antivirais, anticancerígenos, analgésicos e para hiperlipidemia foram aprovados como drogas comerciais. Em virtude do exposto, mostra-se interessante a pesquisa em microrganismos marinhos na busca por novos metabólitos secundários e biologicamente ativos, (GERWICK; MOORE, 2012; GERWICK; FENNER, 2013).

1.4 Apresentação do trabalho

O conteúdo desta tese de doutorado foi dividido em três capítulos, os capítulos I e II são referentes à pesquisa realizada no Brasil e o capítulo III à pesquisa realizada no exterior, UCSD-EUA.

O capítulo I descreve as investigações químicas e de atividades biológicas realizadas em três linhagens de cianobactérias marinhas provenientes de manguezais *Cyanobium* sp. CENA178, *Cyanobium* sp. CENA181 e *Oxynema* sp. CENA135.

O capítulo II relata o experimento de co-cultura realizado com a linhagem de cianobactéria *Cyanobium* sp. CENA181 e do fungo *Penicillium decaturense*, previamente estudado no Laboratório de Química Orgânica do Ambiente Marinho (NPPNS-FCFRP-USP), visando avaliar a interação química dos mesmos.

O capítulo III descreve o trabalho de doutorado-sanduiche (número do processo 234850/2014-0), realizado no período de agosto de 2015 a março de 2016, no laboratório do Prof. Dr. William Gerwick (Scripps Institution of Oceanography (University of San Diego-Califórnia), onde foram investigadas nove espécies de cianobactérias marinhas do gênero *Symploca* com o auxílio de uma ferramenta de redes moleculares (molecular networking), CLAE-EM/EM e RMN, visando a obtenção de novos agentes químicos bioativos.

O trabalho visou contribuir com novos dados químicos e biológicos para a linha de pesquisa no país e amplia as perspectivas futuras com relação aos dados obtidos e futuros projetos.

2. Capítulo I- Prospecção química e biológica de cianobactérias provenientes de manguezais

2.1 INTRODUÇÃO

2.1.1 Cianobactérias

As cianobactérias também conhecidas como cianofíceas ou cianoprocariontas são microrganismos procariontes, pois não apresentam núcleo e estruturas definidas sendo ainda aeróbios fotossintetizantes, pertencendo à classe das bactérias gram-negativas (PEREIRA; SOARES-GOMES, 2009; SANT'ANNA et al., 2006; MELO; NEVES; BAPTISTA, 2011; ENGEL, 2013). Estão presentes no ambiente terrestre há cerca de 3 bilhões de anos (PEREIRA; SOARES-GOMES, 2009; GERWICK; FENNER, 2013).

As cianobactérias constituem o grupo mais vasto e diversificado dos microrganismos procarióticos fotossintetizadores com aproximadamente 2.400 espécies. Habitam os mais variados ecossistemas, como o terrestre, marinho, fluvial, glacial, deserto e águas termais, podendo existir em simbiose com outros organismos, como fungos (SANT'ANNA et al., 2006; MELO; NEVES; BAPTISTA, 2011).

Cianobactérias apresentam algumas vantagens adaptativas a meios inóspitos quando comparadas a outros organismos, como por exemplo, a capacidade de fixar nitrogênio, absorção de luz, tipos de células diferenciadas para reprodução ou descanso e um meio para regular a flutuação, por estes motivos tornam-se capazes de habitar diferentes lugares como mencionado no parágrafo anterior (SANT'ANNA et al., 2006).

As florações que ocorrem ao longo da costa são um aumento da densidade de organismos como algas e cianobactérias, e que muitas vezes podem modificar a coloração da água, devido à presença de substâncias como clorofila *a*, carotenóides e ficobiliproteínas, de ocorrência nas cianobactérias. Essas florações podem acarretar odor, gosto da água alterados e também a produção de toxinas, conhecidas como cianotoxinas, as quais podem aumentar com a presença de nutrientes específicos oriundos do meio ambiente, como a poluição das indústrias,

efluentes domésticos e aquecimento global (SANT'ANNA et al., 2006; CARMICHAEL, 1992; BLUNT et al., 2012; CHOI et al., 2012).

Devido a esse fato, buscam-se novas medidas a fim de evitar danos à saúde pública, como o controle da eutrofização da água, tratamento apropriado para o consumo humano e informações ao público que utilizam reservatórios de água para atividades recreacionais, ampliando o interesse pelo conhecimento dos metabólitos presentes no meio e que ocasionam esses danos à população (LOZA, 2012; BELLÉM, 2013; ENGEL, 2013).

Um grupo conhecido e correlacionado a essas florações são as cianotoxinas que constituem um grupo bastante diversificado, apresentando assim, distintas propriedades tóxicas. Três classes químicas de metabólitos secundários se destacam na produção de cianotoxinas: peptídeos cíclicos (microcistina e nodularina), alcaloides (anatoxinas, saxitoxinas, cilindrospermopsinas, lyngbiatoxina A) e lipopolissacarídeos (SANT'ANNA et al., 2006; VAN APELDOORN et al., 2011).

As cianotoxinas foram classificadas em: hepatotoxinas, como exemplo citam-se a microcistina, nodularina e cilindrospermopsina (**6**) (Figura 3), produzidas por algumas espécies de *Anabaena*, *Nodularia*, *Cylindrospermopsis raciborskii*; as neurotoxinas, que produzem substâncias como, anatoxina-a (S) (**7**) (Figura 3) as saxitoxinas e neo-saxitoxinas e, por fim as citotoxinas, toxinas irritantes e dermatotoxinas, estas produzidas por espécies pertencentes aos gêneros *Lyngbia*, *Oscillatoria* e *Anabaena*, como exemplo a substância aplisiatoxina (**8**) (Figura 3) (CARMICHAEL, 1992; KAEBERNICK; NEILA, 2001; SANT'ANNA et al., 2006; VAN APELDOORN et al., 2011; ZEGURA; TRASER; FILIPIC, 2011).

Figura 3. Toxinas encontradas em cianobactérias

A maioria dos estudos realizados com cianobactérias teve início no Havaí, Caribe, Madagascar e Papua Nova Guiné, abrindo novas possibilidades para locais ainda inexplorados. A pesquisa de produtos naturais em cianobactérias marinhas possui uma alta taxa de descoberta >95% de novos compostos quando comparado a outros recursos microbianos tradicionais (TAN, 2007; GERWICK; FENNER, 2013).

A maior parte dos metabólitos de cianobactérias são produtos a partir da via biossintética para a síntese de polipeptídeos, ribossomais ou não ribossomais - NRPS (peptídeo sintase não ribossomal), policetídeos - PKS e via mista. A principal via produtora de metabólitos secundários em cianobactérias é a via mista (NRPS-PKS) (NUNNERY; MEVERS; GERWICK, 2010; CHOI; PEREIRA; GERWICK 2012).

Além do número expressivo de novos metabólitos secundários isolados de cianobactérias marinhas, estes também apresentam importante potencial farmacológico, exibindo atividade citotóxica, inibição de atividade de certas enzimas, como a protease, atividade anticancerígena, antiviral, antimicrobiana, antiinflamatória e antimalárica (NUNNERY; MEVERS; GERWICK, 2010; SINGH et al., 2011; GERWICK; FENNER, 2013).

Diversos estudos com cianobactérias marinhas vêm demonstrando além das cianotoxinas, novos metabólitos secundários que podem ser encontrados em diferentes espécies.

Um grande número de produtos naturais marinhos demonstrou atividade como inibidores de proteases, inclusive substâncias isoladas de cianobactérias, como a galinamida A (**9**) (Figura 4), que é um potente inibidor da catepsina humana e foi isolada de uma linhagem de cianobactéria denominada *Schizothrix* sp.. Além desta atividade estudos anteriores apontaram que a mesma substância possui atividade antimalárica (LININGTON et al., 2009; MILLER et al., 2014).

Pertencente à ordem Oscillatoriales, o gênero *Moorea*, têm-se mostrado bastante promissor na busca por novas substâncias. Dois novos produtos naturais marinhos de cianobactérias foram isolados de uma coleção da espécie *Moorea producens*, provenientes de Porto Rico, e foram denominados de parguerene (**10**) (Figura 4) e precarriebowmida (MEVERS; BYRUM; GERWICK, 2013).

Além destas substâncias outras já foram isoladas de uma espécie do mesmo gênero da anterior, a *Moorea bouillonii*, um depsipeptídeo cíclico citotóxico inédito, denominado de bouillonamida A (**11**), além de outras substâncias já isoladas na mesma espécie, a ulongamida A e apratoxina A. A bouillonamida A (Figura 4) foi

testada em linhagens de células de neuroblastomas de rato (Neuron 2a), demonstrando moderada atividade citotóxica, enquanto apratoxina A, apresentou atividade significativa, sendo de importância para este tipo de tumor (TAN; OKINO; GERWICK, 2013; GUIRY, M.D.; GUIRY, G.M., 2015).

Figura 4. Substâncias isoladas de cianobactérias marinhas das espécies *Schizothrix* sp. (**9**), *Moorea producents* (**10**) e *Moorea bouillonii* (**11**)

Um novo depsipeptídeo, denominado de caldoramida (**12**) (Figura 5), isolada da cianobactéria *Caldora penicillata* foi ativo em linhagens tumorais HCT116 de câncer colorretal, com citotoxicidade diferencial para genes oncogênicos KRAS (GUNASEKERA et al., 2016).

Além das substâncias supracitadas, outra inédita foi isolada de uma espécie de cianobactéria marinha *Rivularia* sp. (pertencente à ordem Nostocales), denominada de viequeamida A (**13**) (Figura 5), a qual demonstrou atividade citotóxica na linhagem celular cancerígena H460 de pulmão humano (BOUDREAU et al., 2012).

Figura 5. Substâncias isoladas de cianobactérias marinhas com potencial anticancerígeno

A produção de metabólitos secundários estruturalmente variados e pertencentes a gêneros diferentes, aliada aos processos de adaptação das cianobactérias, encoraja a sua exploração para obtenção de produtos desconhecidos e bioativos (NUNNERY; MEVERS; GERWICK, 2010; LEÃO et al., 2012; TAN, 2013).

2.1.2 Manguezais

Os manguezais são ecossistemas costeiros constituídos por florestas que são capazes de suportar grandes variações de hidratação e salinidade, com variações de água do mar e água doce. São considerados uma transição entre o ambiente terrestre e marinho e encontrados em regiões tropicais e subtropicais. A sua floresta possui característica peculiar, onde são encontradas vegetações com raízes aéreas, capazes de acumular sedimentos orgânicos e inorgânicos e de abrigar uma grande quantidade de microrganismos como bactérias, cianobactérias, microalgas e fungos (CUNHA-LIGNON et al., 2009; MASSÓ I ALEMÁN et al., 2010; SILVA et al., 2014; LEE et al., 2014; ALVARENGA et al., 2015)

Essas florestas assumem um papel de proteção da região costeira, além de fornecer nutrientes e uma variedade de produtos florestais madeireiros e não-madeireiros, além de promover o turismo local (CUNHA-LIGNON et al., 2009; MASSÓ I ALEMÁN et al., 2010; FELLER et al., 2010).

Com relação ao papel das cianobactérias em ambientes de manguezais, estas contribuem com a fixação de carbono e nitrogênio e em ambientes extremos como os mangues, as suas células agem como armazenadoras de fósforo. Dessa forma, elas interagem com esse ecossistema fornecendo nutrientes para as plantas e também substâncias que atuam como mecanismo de defesa. As cianobactérias podem ser encontradas em rochas, sedimentos, raízes subterrâneas e aéreas, na água e vivendo em associação com macro e microrganismos (ALVARENGA et al., 2015).

A importância das cianobactérias em manguezais está no auxílio a conservação do mesmo e atuam como bioestimulantes ou biorremediantes na recuperação de manguezais em degradação (ALVARENGA et al., 2015).

No Brasil, os manguezais recobrem cerca de 25.000 km², e destes 240 km² pertencem ao litoral do estado de São Paulo. Um estudo realizado em manguezais brasileiros (Ilha do Cardoso e Bertioga-São Paulo) identificou cinquenta linhagens de cianobactérias pertencentes a oito gêneros, onde foram identificadas cianobactérias unicelulares, filamentosas heterocitadas e não-heterocitadas através de estudos taxonômicos e de biologia molecular e a partir dessas linhagens também foram identificados genes produtores de toxinas. (SILVA et al., 2014).

Os estudos relacionados à cianobactérias em manguezais ainda são escassos o que sugere a possibilidade de novos gêneros a serem descobertos (ALVARENGA et al., 2015) e novos componentes químicos a serem revelados.

O presente trabalho teve como objetivo o estudo químico e biológico de três linhagens de cianobactérias isoladas de manguezais e presentes no artigo citado acima de Silva et al. (2014), os gêneros *Cyanobium* sp. e *Oxynema* sp. serão abordados a seguir.

2.1.3 Gênero *Cyanobium*

O primeiro relato do gênero foi publicado por Rippka e Cohen-Bazire (1983), ele é descrito taxonomicamente como unicelular, suas células não se apresentam em colônias e sim em pares ou solitárias após a divisão. Essas células são ovais e possuem até 4 µm de comprimento por 1-2 µm de largura, apresentam pouca ou nenhuma mucilagem e coloração azul-esverdeada a oliva, acinzentada ou avermelhada (KOMÁREK, 2003; GUIRY, 2016).

Este gênero pode ser considerado plânctônico, bentônico e epifítico, sendo encontrado tanto em água doce como em água do mar. Até o momento estão presentes em bancos de dados quatorze espécies aceitas (KOMÁREK, 2003; GUIRY, 2016) e o tratamento taxonômico adotado está em Komárek et al. (2014).

Com relação à química deste gênero, no litoral de Portugal, Leão et al. (2013) identificaram na espécie *Cyanobium* sp. LEGE 06113 (pertencente à ordem Synechococcales), uma substância denominada hierredina B (**14**) (Figura 6), com atividade antitumoral contra adenocarcinomas de cólon.

Figura 6. Substância isolada da linhagem *Cyanobium* sp. LEGE 06113

2.1.4 Gênero *Oxynema*

Este gênero é relativamente recente e deriva do gênero *Phormidium*, sua descrição aparece em 2012 por Chatchawan et al., e apresenta filamentos cilíndricos, estreitos e que se alongam na extremidade. Suas células apresentam-se mais curtas do que largas e possuem 2-3 µm de comprimento. Podem ser vistas sob a forma de tapetes com coloração brilhante de azul a verde ou verde-escuro. Atualmente existem três espécies aceitas nos bancos de dados: *Oxynema acuminatum*, *Oxynema lloydianum*, *Oxynema thaianum* (CHATCHAWAN, 2012; KOMÁREK et al., 2014; GUIRY, 2016).

2.2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral a busca de agentes biologicamente ativos em três linhagens de cianobactérias provenientes de mangue *Cyanobium* sp. CENA178, *Cyanobium* sp. CENA181 e *Oxynema* sp. CENA135.

2.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Realizar a triagem química (CCD, CLAE, CG-EM, CLAE-EM, RMN de ^1H) dos extratos e frações obtidas das culturas das cianobactérias isoladas;
- ✓ Avaliar as atividades antimicrobianas e antifúngicas dos extratos e frações que apresentarem perfis químicos mais interessantes;
- ✓ Avaliar a atividade anticolinesterásica dos extratos e frações;
- ✓ Analisar a presença de cianotoxinas através de EM;
- ✓ Proceder ao isolamento e à elucidação estrutural dos constituintes majoritários dos extratos ativos das espécies mais promissoras.

2.3. MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 Material e equipamentos utilizados

Solventes

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

Meios de cultivo

- ✓ Meio SWBG-11 (Sea water BG-11)
- ✓ Meio ASNIII

A composição de ambos pode ser vista na Tabela 1:

Tabela 1- Componentes do meio SWBG-11 (A) e ASNIII (B)

Componentes	Concentração final no meio (g/L)	
	A	B
1.NaCl	12,5	12,5
2.MgCl ₂ .6H ₂ O	1,0	1,0
3 KCl	0,25	0,25
4.NaNO ₃	1,5	0,75
5.K ₂ HPO ₄	0,04	-
6 K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	-	0,02
7.MgSO ₄ .7H ₂ O	0,075	3,5
8.CaCl ₂ .2H ₂ O	0,036	0,5
9.Ácido Cítrico	0,006	0,003
10.Citrato de Amônio Férrico	0,006	0,003
11.Na ₂ EDTA	0,001	0,0005
12.Micronutrientes ¹	1 mL	1 mL
13 Na ₂ CO ₃	0,02	0,02

*Valor absoluto adicionado a cada 1L de meio de cultura preparado.¹**Solução de micronutrientes (A e B):** H₃BO₃ (2,86 g/L); MnCl₂.4H₂O (1,81 g/L); ZnSO₄.7H₂O (0,222 g/L); Na₂Mo₄.2H₂O (0,39 g/L); CuSO₄.5H₂O (0,079 g/L); Co(NO₃)₂.6H₂O (0,049 g/L).

Cromatografia em camada delgada (CCD)

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

Cromatografia líquida a vácuo

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

Equipamentos

- ✓ Centrífuga da marca Hitashi® modelo CR22GII;
- ✓ Fluxo laminar esterilizado – Pachane, Autoclave vertical - PHOENIX;
- ✓ Evaporador rotativo da marca Buchi®, modelo R-210;
- ✓ Cromatógrafo da marca Shimadzu®, modelo SCL-10AVP, com detector de arranjo de diodos modelo SDP-M10AVP;
- ✓ Purificador Millipore Sist-Direct-Q5, filtro 0,22 µm;

- ✓ CLAE Shimadzu®, binário, bombas LC-6AD, detector UV-VIS SPD 20A, controlador CBM 20A com coletor automático (laboratório de Espectrometria de Massas, do Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes, Departamento de Química, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP);
- ✓ CLAE-DAD Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific®);
- ✓ Cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM), modelo QP-2010, Shimadzu®; equipado com injetor split (270 °C), pressão 89,9 KPa (Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes, Departamento de Física e Química, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP);
- ✓ CLAE-EM da marca Shimadzu® Prominence LC system, analisador Quadrupolo (MicroTOF-QII; Bruker Daltonics, MA) (Prof. Dr. Ernani Pinto Jr.; Faculdade de Ciências Farmacêuticas de São Paulo-USP);
- ✓ Infravermelho FT-IR Spectrometer Spectrum Two (Perkin Elmer®), Departamento de Química-FFCLRP;
- ✓ Espectrômetro de massas da marca Bruker, modelo micrOTOF II com fonte de ionização em elétron-spray (ESI), com analisador do tipo tempo de voo (TOF), Calibrante: NaTFA (Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes, Departamento de Física e Química, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP);
- ✓ Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear, equipamento de RMN da marca Bruker, modelo DRX 500 (500 MHz), Departamento de Química-FFCLRP-USP; e BRUKER AVANCE III 600 HD, operando em 600 MHz (Instituto de Química-UNESP-Araraquara).

2.4 Coleta, isolamento e identificação taxonômica das linhagens de cianobactérias

2.4.1 Coleta

Amostras provenientes de manguezal, coletadas da Ilha do Cardoso (25°05'02''S/47°57'42''W), do Estado de São Paulo (SILVA et al., 2014), pertencentes ao Laboratório de Ecologia Molecular de Cianobactérias sob a responsabilidade da Profa. Dra. Marli F. Fiore (Centro de Energia Nuclear na Agricultura, CENA/USP) foram acondicionadas em caixas térmicas e transportadas

ao Laboratório de Química Orgânica do Ambiente Marinho-NPPNS (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, FCFRP/USP), Figura 7.

Figura 7. Culturas de cianobactérias coletadas na Ilha do Cardoso-SP, pertencentes às ordens Chroococcales e Oscillatoriales mantidas no Laboratório de Química Orgânica do Ambiente Marinho -NPPNS, FCFRP-USP

Tabela 2- Linhagens de cianobactérias isoladas de manguezais do Estado de São Paulo

Ordem	Linhagem	Manguezal e local de coleta	Meio de cultivo
Synechococcales	<i>Cyanobium</i> sp. CENA178	Ilha do Cardoso – solo	SWBG-11
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA181	Ilha do Cardoso – solo	SWBG-11
Oscillatoriales	<i>Oxynema</i> sp. CENA135	Ilhado Cardoso – solo	ASN III

A morfologia das linhagens da tabela 2, pode ser vista na Figura 8 abaixo:

Figura 8. Culturas de cianobactérias coletadas e isoladas da Ilha do Cardoso mantidas no Laboratório de Química Orgânica do Ambiente Marinho –NPPNS-FCFRP-USP. A- *Cyanobium* sp. CENA178; B- *Cyanobium* sp. CENA181; C- *Oxynema* sp. CENA135. (Créditos das Fotomicrografias: Diego Bonaldo Genuário – CENA-USP)

2.4.2 Isolamento e identificação taxonômica

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

Foi acrescentado ao meio 100 μL de vitamina B para 1L de meio SWBG-11 às linhagens *Cyanobium* sp. CENA178 e *Cyanobium* sp. CENA181 e também foram feitos brancos do meio como controle.

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

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

2.5 Extração, fracionamento e triagem química preliminar dos metabólitos

2.5.1 Extração e fracionamento

Os meios de cultivo contendo as linhagens unicelulares *Cyanobium* sp. CENA178 e *Cyanobium* sp. CENA181, foram centrifugados em tubos de cultura de 500 mL, a 7.000 rpm/12 min. O sobrenadante foi acondicionado e rotaevaporado até quantidade suficiente para extração e para avaliação do perfil químico. A seguir a massa precipitada foi levada para liofilizar e para obtenção da massa seca.

O meio de cultura contendo a linhagem filamentosa *Oxynema* sp. CENA135, foi filtrado em funil de Büchner com papel filtro, esta linhagem não foi liofilizada e os filamentos foram levados a extração.

A biomassa de cada linhagem de cianobactéria *Cyanobium* sp. CENA178, *Cyanobium* sp. CENA181 e *Oxynema* sp. CENA135 foi extraída com diclorometano:metanol (2:1), cinco vezes sendo quatro vezes de 30 min cada a frio sob agitação e mais uma vez sob aquecimento sensível ao toque. Os extratos brutos obtidos foram filtrados a vácuo e concentrados em evaporador rotativo (Tabela 3). Estes extratos foram armazenados ao abrigo da luz e calor para posterior fracionamento.

Tabela 3- Rendimentos obtidos dos cultivos de cianobactérias das linhagens *Cyanobium* sp. CENA178, *Cyanobium* sp. CENA181 e *Oxynema* sp. CENA135

Linhagem	Quantidade em litros (L)	Massa seca (g)	Extrato bruto (g)
<i>Cyanobium</i> sp. CENA178	12	9,66	1,13
<i>Cyanobium</i> sp. CENA181	21	24,52	2,40
<i>Oxynema</i> sp. CENA135	20	Não lioofilizada	1,80

Os extratos brutos de *Cyanobium* sp. CENA178 e *Cyanobium* sp. CENA181 foram inicialmente fracionados por cromatografia líquida a vácuo (CLV). O gradiente de solventes foi feito com polaridade crescente (n-Hexano, acetato de etila e metanol)- Fração A: 100% Hex; Fração B: 90% Hex/10% AcOEt; Fração C: 80% Hex/20% AcOEt; Fração D: 60% Hex/40% AcOEt; Fração E: 40% Hex/60% AcOEt; Fração F: 20% Hex/80% AcOEt; Fração G: 100% AcOEt; Fração H: 75% AcOEt /15% MeOH; Fração I: 100% MeOH, conforme metodologia utilizada no laboratório do Prof. William H. Gerwick (Scripps Institution of Oceanography – UCSD – San Diego-EUA).

A linhagem *Oxynema* sp. CENA135 foi fracionada em cartucho de sílica Sep-Pak C18. Fase móvel: (acetonitrila/água, acetato de etila e diclorometano) Fração A: 25% ACN; Fração B: 50% ACN; Fração C: 75% ACN; Fração D: 100% ACN; Fração E: 100% AcOEt; Fração F: 100% CH₂Cl₂.

2.5.2 Triagem química preliminar

Os extratos brutos e frações foram injetados em CLAE-DAD em sistema binário, coluna Supelcosil LC18 (25 cm x 4,6 mm x 5 µm), modo analítico, gradiente

exploratório, FM: H₂O+ACN (0,05% ácido fórmico): 0 min- 5%; 40 min-100%; 45 min-100%; 50 min-5%; 60 min-5%, vazão de 1 mL/min, injeção de 20 µL, amostras na concentração de 1mg/mL, com detector operando na faixa de UV de $\lambda=110-600$ nm e, também foram realizadas CCDs para escolha das frações mais interessantes.

2.6 Isolamento, purificação dos compostos isolados e avaliação das atividades biológicas dos extratos e frações

Os extratos e frações que apresentaram perfil químico interessante foram submetidos a procedimentos de isolamento e identificação de substâncias. Os procedimentos de extração e fracionamento foram os mesmos citados no item 2.5.

O fluxograma (Figura 9) abaixo mostra, como foi realizado o fracionamento do extrato bruto de *Cyanobium* sp. CENA178.

Figura 9. Fluxograma do isolamento e purificação da substância CENA178_2M a partir do extrato bruto de *Cyanobium* sp. CENA178

Foi realizada uma pré-purificação com as frações H e I, onde notou-se presença de sílica nas frações e uma perda significativa de massa, com esta subfração foi realizado um novo fracionamento em gradiente de MeOH: H₂O de 50 a 100%, aumentando a cada 5%, 100% de AcetOEt e 100% de CH₂Cl₂.

Para o fracionamento da fração CENA178_H_1A, foi utilizada coluna semi-preparativa Zorbax Eclipse C18 (9,4 x 250 mm x 5 μ M), da marca Agilent®. Fase móvel: MeOH:H₂O (ácido fórmico 0, 1%). Gradiente: 0-30 min (2 a 100% de MeOH); 30-35 min (100% de MeOH). Vazão: 4,0 mL/min. UV: 254 nm e 350 nm, realizada no laboratório de Espectrometria de Massas, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes, Departamento de Química, FFCLRP-USP. A coleta foi realizada de um em um minuto e a fração selecionada foi em dois minutos.

Com a linhagem *Cyanobium* sp. CENA 181 foi realizado um fracionamento via CLV, onde foram obtidas nove frações. As frações H e I foram reunidas e subfracionadas em Sep-Pak C18, em gradiente de ACN:H₂O 25% a 100% ACN, aumentando a cada 25%, 100% de MeOH e 100% de CH₂Cl₂. Após análises em CLAE e CCD, a subfração A apresentou um perfil mais interessante sendo chamada de CENA181_H1 (Figura 10).

Figura 10. Fluxograma do isolamento e purificação da substância CENA181_H1 a partir do extrato bruto de *Cyanobium* sp. CENA181

A partir do fracionamento de *Oxynema* sp. CENA135 descrito no item 2.5.1 na p. 19, foi dada sequência no isolamento e purificação das frações (Figura 11).

Figura 11. Fluxograma do isolamento e purificação das substâncias CENA 135_A1_3a, CENA 135_A1_3b, CENA135_A1_3_2 a partir do extrato bruto de *Oxyenema* sp. CENA135

A fração CENA135_A_1_A foi injetada em CLAE com coletor automático e a coleta foi realizada de minuto em minuto, a fração selecionada foi coletada em três minutos e denominada de CENA135_A_1A_3. Para verificação da pureza a fração CENA135_A_1A_3 foi injetada em CLAE-DAD em coluna analítica Shimadzu® (Shim-pack LC8 250 x 4,6mm x 5 μm). Fase móvel: MeOH:H₂O (ácido fórmico 0,1%). Gradiente: 0-30 min (2 a 100% de MeOH) e 30-35 min (100% de MeOH). Vazão: 1,0 mL/min.

A seguir a amostra foi injetada em coluna semi-preparativa da marca Shimadzu® (Shim-pack LC8 250 x 20 mm x 5 μm) Fase móvel: MeOH:H₂O (ácido fórmico 0,1%). Gradiente: 0-30 min (2 a 100% de MeOH) e 30-35 min (100% de MeOH) (v/v). Vazão: 9,0 mL/min.

As cinco substâncias isoladas foram analisadas em cromatografia em camada delgada (CCD) e reveladas com anisaldeído, iodo ressublimado, iodo-cloro-platinado e luz ultravioleta.

2.6.1 Análise de cianotoxinas e cianopeptídeos por CLAE-EM

As análises foram feitas em colaboração com o Prof. Dr. Ernani Pinto Jr. (Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP-SP). As linhagens *Cyanobium* sp. CENA178 e *Cyanobium* sp. CENA181 foram centrifugadas e liofilizadas. Para a obtenção do extrato bruto, a massa liofilizada foi extraída com MeOH (70%), e as amostras foram preparadas na concentração de 1,0 mg/mL (MeOH:H₂O) e injetadas em CLAE-EM. Foi selecionada uma janela de *m/z* 50 a 3000 para análise do perfil de cianotoxinas.

Foi utilizada coluna Phenomenex® Luna® (C18 (2) 250x 3,00 mm x 5 µm), a 35 °C, fase móvel: A: 5mM formiato NH₄ + 0,1% Ácido Fórmico; B: Acetonitrila. Gradiente: 0-50 min (5-90% de ACN); 50-55 min (90% de ACN); 55-56 min (90-5% de ACN). Vazão: 0,2 mL/min. Vol. de injeção: 5 µL. As análises foram feitas em ESI, modo positivo.

Os padrões usados foram: microviridina, aeruginosina, cianopeptolina e microcistina.

2.6.2 Análises em CG-EM

As frações n-hexano/acetato de etila (9:1) da linhagem *Cyanobium* sp. CENA178, n-hexano da espécie *Cyanobium* sp. CENA181 e acetato de etila da espécie *Oxynema* sp. CENA135, com concentração final de 1,0 mg/mL foram analisadas em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM), em coluna EN5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, SGE Analytical Science®), vazão: 1,20 mL/min, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes (FCFRP-USP).

Os valores considerados confiáveis para as substâncias identificadas na análise foram iguais ou superiores a 90% de similaridade, além de cálculos utilizando o índice de Kovats. A programação da temperatura do equipamento durante a análise pode ser observada na Tabela 4 a seguir:

Tabela 4- Programação de temperatura do CG-EM durante a análise das frações

Taxa de aquecimento (°C/min)	Temperatura (°C)	Tempo (min)
-	100,0	3,0
10,0	220,0	10,0
15,0	310,0	20,0

2.7 Avaliação das atividades biológicas dos extratos e frações

2.7.1 Avaliação da atividade antibacteriana

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

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

Determinação da concentração inibitória mínima (MIC). Foi utilizado o método de microdiluição em microplaca segundo a metodologia preconizada pelo “National Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS, 2003), atualmente denominado Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), com adaptações. Foram utilizadas para a preparação dos inóculos e posterior realização dos ensaios, bactérias de crescimento de 24h nos meios de cultura apropriados. Os inóculos foram padronizados em espectrofotômetro por comparação com o tubo 0,5 da escala de McFarland.

Em microplacas foram depositados o caldo Mueller Hinton com os extratos ou substâncias e testadas nas concentrações de 50 a 400 µg/mL e os inóculos tendo um volume final em todos os poços de 100 µL. Penicilina e estreptomicina foram utilizadas como controles positivos. Foram realizados os controles de esterilidade do caldo, extratos testados e padrões, bem como os controles de crescimento das culturas. As placas foram incubadas a 37 °C em estufa bacteriológica por 24 h. Após o tempo de incubação foi adicionado em cada poço 30 µL de sal de tetrazólio na

concentração de 0,02% preparado em solução aquosa. Para a realização da leitura foi observada a mudança de coloração da mesma através de uma reação de oxidação-redução.

2.7.2 Avaliação da atividade antifúngica

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

Para este experimento foi utilizada a mesma metodologia do item 2.7.1, e como controle positivo, utilizou-se para as leveduras o antifúngico Fluconazol (Sigma®).

As seguintes cepas foram utilizadas: *Candida albicans* ATCC, *Candida tropicalis* ATCC 750, *Candida krusei* ATCC 34135, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida glabrata* ATCC 2001.

2.7.3 Avaliação da atividade antifúngica frente a fungos fitopatogênicos

Os experimentos para avaliação da atividade antifúngica foram realizados sob a supervisão da Profa. Dra. Maria Cláudia Marx Young (Departamento de Fisiologia Vegetal – Instituto de Botânica – São Paulo).

Foram utilizados os fungos fitopatogênicos filamentosos *Cladosporium cladosporioides* Fresen de Vries SPC 140 e *Cladosporium sphaerospermum* Penzig SPC 491 do Instituto de Botânica, São Paulo-SP.

Para o ensaio de atividade antifúngica foi utilizado o método de autobiografia (RHALISON, 1991; LOPES et al., 2004). Durante o ensaio, 10 µL das soluções de extratos brutos foram testados na concentração de 400 µg/10 µL (diclorometano). As amostras foram aplicadas em placas de CCD, sendo eluídas com sistema de solventes adequado. Após secagem do solvente, as placas cromatográficas foram aspergidas com uma suspensão de esporos de *C. sphaerospermum* e *C. cladosporioides* em meio nutritivo e então incubadas por 48 h a 37 °C. Depois da incubação, o aparecimento de zonas claras contra um fundo escuro indicou a

atividade antifúngica da amostra. Nistatina (5 µg/µL) foi utilizada como padrão positivo.

Foram testados os extratos brutos das linhagens *Cyanobium* sp. CENA178 e *Cyanobium* sp. CENA181 foram testados na concentração acima e eluídas nas fases móveis n-Hexano:Acetato 6:4 e n-Hexano: Acetato 1:1, respectivamente. As placas de CCD foram reveladas a 254 nm, 366 nm e luz branca.

2.7.4 Avaliação da atividade anticolinesterásica

Os experimentos para avaliação da atividade anticolinesterásica foram realizados sob a supervisão da Profa. Dra. Maria Cláudia Marx Young (Departamento de Fisiologia Vegetal – Instituto de Botânica – São Paulo).

Para a avaliação da atividade inibidora de acetilcolinesterase foi empregado um método padronizado por Marston et al. (2002). Neste método, a amostra é aplicada em placas de CCD e testada em uma faixa de concentração decrescente, eluída com um sistema de solventes apropriado. Após a secagem dos solventes, as placas são aspergidas com uma solução contendo 6,66 U/mL de AChE eletríc eel tipo V (Sigma-Aldrich; produto nº. C2888), secas novamente e a seguir incubadas a 37 °C por 20 min em uma atmosfera úmida.

A atividade da enzima é detectada pela aspersão das placas com uma solução recém-preparada contendo acetato de 1-naftil (0,25%) em EtOH (1 vol.) e sal Fast Blue B (0,25%) em água (4 vol.). O potencial inibidor de acetilcolinesterase é evidenciado pelo aparecimento de zonas claras em um fundo cor púrpura. O padrão utilizado foi Fisostigmina a 0,05 µg/2,5 µL.

Foram testados os extratos brutos das linhagens *Cyanobium* sp. CENA178 e *Cyanobium* sp. CENA181 foram testados na concentração de 400 µg/10 µL (diclorometano) e eluídas nas fases móveis n-Hexano:Acetato 6:4 e n-Hexano: Acetato 1:1 (v/v), respectivamente. As placas foram reveladas em 254 nm, 366 nm e luz branca, como descrito no item anterior.

2.8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.8.1 Triagem química preliminar

Os extratos brutos e frações das linhagens *Cyanobium* sp. CENA178, *Cyanobium* sp. CENA181 e as frações de *Oxynema* sp. CENA135, foram submetidas à análise via CCD. Estes mesmos extratos e frações também tiveram seu perfil químico avaliado por meio de CLAE-DAD, com a finalidade de avaliar o perfil químico das amostras.

As CCDs demonstraram a presença de compostos nitrogenados, para os extratos brutos das linhagens *Cyanobium* sp. CENA178 e *Cyanobium* sp. CENA181, nas frações H+I e na subfração 3 de *Oxynema* sp. CENA135. As placas foram reveladas com o iodo-cloro-platinado e comparadas com padrões dos aminoácidos arginina (aminoácido alifático) e guanina (aminoácido cíclico), formando manchas brancas, como resultado positivo, as amostras apresentaram absorção no UV abaixo de 300 nm. Nas frações em que foram vistas substâncias nitrogenadas, observou-se que a presença das mesmas ocorreu nas frações mais polares.

Em virtude disso, as frações foram trabalhadas visando o isolamento de possíveis substâncias nitrogenadas como, por exemplo, peptídeos e alcaloides.

2.8.2 Isolamento, purificação e avaliação das atividades biológicas dos compostos obtidos

Foram isoladas cinco substâncias das linhagens estudadas: CENA178_2M de *Cyanobium* sp. CENA178; CENA181_H1 de *Cyanobium* sp. CENA181; CENA135_A1_3a, CENA135_A1_3b e CENA135_A1_3_2, estas de *Oxynema* sp. CENA135, os quais apresentam aspecto oleoso e cor amarelo claro. São insolúveis em acetona, clorofórmio, dimetilsulfóxido e piridina. As amostras para análise em RMN 1-D e 2-D foram solubilizadas em mistura de metanol-D4 e óxido de deutério (2:1).

2.8.3 *Cyanobium* sp. CENA178 e *Cyanobium* sp. CENA181

CENA178 2M e CENA181 H1

As estruturas das substâncias CENA178_2M e CENA181_H1 não puderam ser determinadas devido à sobreposição de sinais nos espectros de RMN e complexidade das amostras evidenciadas nos cromatogramas.

2.8.4 *Oxynema* sp. CENA135

CENA135 A1 3a, CENA135 A1 3b e CENA135 A1 3 2

As substâncias CENA135_A1_3a ($t_R = 23,0$ min), CENA135_A1_3b ($t_R = 26,0$ min) e CENA135_A1_3_2 ($t_R = 27,5$ min) foram obtidas em coluna semi-preparativa C8 como descrito no item 2.6 e o cromatograma pode ser visto na Figura 13.

Figura 13. Cromatograma da subfração CENA135_A_1 de *Oxynema* sp. CENA135, Fase móvel: MeOH:H₂O (ácido fórmico 0,1%). Gradiente: 0-30 min (2 a 100% de MeOH) e 30-35 min (100% de MeOH) (v/v), $\lambda = 238$ nm

Os espectros de absorção na região do Infravermelho das três substâncias apresentaram resultados semelhantes entre si, foram observadas bandas de estiramento em torno de 1.050 cm^{-1} , valor que se refere à ligação C-O; uma banda de carbonila de amida em torno de $1.629,2\text{ cm}^{-1}$ e uma banda larga e intensa na

região de $3.383,3 \text{ cm}^{-1}$, referente a OH e NH, os quais coincidem com sinais de aminoácidos (Figura 14) (BARBOSA, 2007; PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2010).

Figura 14. Espectro de absorção na região do Infravermelho da substância CENA135_A1_3b

As substâncias isoladas apresentaram dados químicos muito semelhantes através da análise dos espectros de absorção na região do e RMN (Anexo A-Figuras 47, 48 e 52), foi observado que o espectro de CENA135_A1_3b (Anexo A-Figura 48) é uma mistura das outras duas.

Os dados provenientes da análise de espectrometria de massas não foram conclusivos para determinação das estruturas que estavam em mistura.

Nos espectros de RMN ^1H CENA135_A1_3a e CENA135_A1_3b foram vistos dois dupletos com sinais metílicos em aproximadamente δ 1,32 (3H; d; $J= 6,5 \text{ Hz}$) e δ 1,47 (3H; d; $J= 7,1 \text{ Hz}$), estes estão correlacionados a carbonos com deslocamentos químicos δ 19,5 e δ 16,0, respectivamente (Anexo A-Figuras 48, 47 e 50). Multipletos também foram observados na região de δ 3,22 - δ 3,46, ligados a carbonos na faixa de δ 48,9- 60,5, estes sinais são observados em aminoácidos e açúcares, eles desblindam devido a proximidade da ligação com heteroátomos como N ou O (Anexo A-Figuras 47-51).

Um deslocamento observado em δ 3,60 (1H; m) está ligado em um carbono δ 62,6 e outro sinal em δ 3,66 (1H, m) está correlacionado ao carbono δ 54,2, este corresponde ao H metínico do aminoácido alanina O deslocamento em δ 8,44 no mapa de contorno HMQC não correlacionou com nenhum carbono. No mapa de contorno HMBC alguns deslocamentos entre δ 171,6 – δ 174,7, indicam a possibilidade de existirem carbonilas de amida (Anexo A-Figuras 47-51).

Por meio dos espectros de HMBC e COSY foi possível correlacionar os sinais com os aminoácidos alanina e treonina (Anexo A-Figuras 49 e 51)

O espectro de RMN ^1H CENA135_A1_3_2 (Anexo A-Figura 51) apresenta dois dupletos com deslocamentos em δ 1,03 (3H; d; $J=6,9$ Hz) e δ 1,09 (3H; d; $J=6,9$ Hz), ligados a carbonos δ 16,5 e δ 17,7 respectivamente. Por meio de COSY, foi possível observar a correlação com o multipletto em δ 2,30 (1H; m), que em HMQC está ligado a carbono δ 29,0 e outro multipletto em δ 3,56 (1H; m; $J=9,5$ Hz) está ligado a carbono δ 62,5, esses deslocamentos podem ser vistos no Anexo A-Figuras 52-54). Através do HMBC foi possível ver que estes sinais também estão próximos a um carbono quaternário em δ 173,0 (Anexo A-Figura 55). Esses sinais correlacionados, são bem próximos ao do aminoácido valina (Figura 15) (BOUDREAU et al., 2012).

Figura 15. Porções do composto relacionadas aos aminoácidos alanina, treonina e valina de acordo com os espectros de 1-D e 2-D

A partir destes resultados, diferentes formas de abordagem devem ser adotadas para obtenção de novos metabólitos secundários, como por exemplo, a modificação do meio de cultura a fim de mimetizar o meio natural.

Deve ser considerado também que muitos microrganismos quando retirados do seu ecossistema e colocados em meios de cultura em laboratório acabam não produzindo substâncias que produziram no seu ambiente natural ou produzindo substâncias completamente diferentes do que produziram (HERTWECK, 2009; SCHERLACH; HERTWECK, 2009; GRAM, 2014; REEN et al., 2015).

2.8.5 Análise de cianotoxinas e cianopeptídeos por CLAE-EM

Não foram encontradas microviridina, aeruginosina, cianopeptolina ou microcistina nos extratos analisados empregando a abordagem descrita no item 2.6.1.

Os autores SILVA et al., 2014 avaliaram a presença de genes de microcistina, os quais foram encontrados nas linhagens *Cyanobium* sp. CENA178 e *Oxynema* sp. CENA135. Devido a este resultado, esperava-se que por meio de análises via CLAE-EM pudesse ser constatada a presença desta classe de metabólitos na espécie estudada. Então, este dado mostra que a espécie possui capacidade de produção da substância, porém, por algum motivo está inibida, o que pode ocorrer em amostras ambientais quando colocadas em laboratório como mencionado anteriormente (HERTWECK, 2009; SCHERLACH; HERTWECK, 2009; GRAM, 2014; REEN et al., 2015).

2.8.6 Análises em CG-EM

As frações de baixa polaridade foram avaliadas por CG-EM e o índice de retenção de Kovats foi calculado através da fórmula:

$$I = 100 \times n + (N - n) \left\{ \frac{\text{tr}(\text{desconhecido}) - \text{tr}(n)}{\text{tr}(N) - \text{tr}(n)} \right\}, \text{ onde:}$$

tr= tempo de retenção;

n= número de carbonos do menor alcano;

N= número de carbonos do maior alcano

Os resultados do CG-EM, encontram-se na tabela abaixo (Tabela 5):

Tabela 5- Principais substâncias encontradas nas frações de baixa polaridade analisadas via CG-EM, com similaridade maior que 90% (banco de dados do equipamento):

Fração n-hexano/acetato de etila (9:1) de <i>Cyanobium</i> sp. CENA178					
Componente	Tempo de retenção (min)	Similaridade (%)	Área (%)	Índice de Retenção obtido	Índice de retenção de literatura
2,4-bis (1,1-dimetiletil) fenol	10,730	94	1,16	1513	1519
(Z)-7-Hexadeceno	12,836	96	0,88	1688	1614
6,10,14-trimetil-2-pentadecanona	14,520	93	0,38	1841	1845
Eicosano	12,978	98	1,56	1998	1999
Fração n-hexano de <i>Cyanobium</i> sp. CENA181					
Dodecanal	9,509	93	1,48	1400	1408
Heptadecano	13,165	96	3,44	1699	1711
Ácido tetradecanóico (Ácido mirístico)	13,839	91	2,44	1729	1748
Neoftadieno	14,680	91	23,21	1877	1823
Fitol	18,250	92	2,98	2115	2077
Fração acetato de etila de <i>Oxynema</i> sp. CENA135					
Heptadecano	13,172	97	11,65	1700	1711
Neoftadieno	14,688	92	51,64	1877	1823
[R-[R*, R*-(E)]]-3,7,11,15-tetrametil-2-hexadeceno	14,757	92	8,88	1881	1802
1-Octadecino	15,139	91	16,12	1892	1846

A porcentagem de substâncias desconhecidas para cada fração é de: 0,28%; 14,86% e 0,55%, referentes a CENA178; CENA181 e CENA135, respectivamente.

Com a avaliação dos dados obtidos e em comparação com o índice de Kovats observados na literatura os componentes encontrados na fração hexano/acetato de etila (9:1) da linhagem *Cyanobium* sp. CENA178 foram: 2,4-bis (1,1-dimetiletil) fenol, (Z)-7-Hexadeceno; 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona e eicosano.

A substância 2,4-bis (1,1-dimetiletil) fenol já foi identificada em uma bactéria de origem marinha *Vibrio alginolyticus* G16 associada à alga vermelha *Gracilaria gracilis* e mostrou uma série de resultados interessantes, como a interferência na comunicação celular, redução do biofilme, protease e outras enzimas da bactéria

patogênica *Serratia marcescens*, além de aumentar a sensibilidade da gentamicina contra este microrganismo, um fato relevante que pode contribuir na eficácia do antibiótico. Outros estudos já reportaram 2,4-bis (1,1-dimetiletil) fenol com atividade antioxidante, anticâncer e antimicrobiana em fungos e plantas (PADMAVATHI; ABINAYA; PANDIAN, 2016).

Na fração n-hexano da espécie *Cyanobium* sp. CENA181 o componente majoritário observado foi o hidrocarboneto neoftadieno, com similaridade de 96%. O mesmo componente foi observado na fração de acetato de etila da espécie *Oxynema* sp. CENA135 com similaridade de 92%. Nesta linhagem também foram identificadas as substâncias heptadecano, $[R-[R^*, R^*-(E)]- 3,7,11,15\text{-tetrametil-2-hexadeceno}]$ e octadecino, as quais puderam ser confirmadas através do índice de Retenção de Kovats que foi semelhante aos observados na literatura (TELLEZ; SCHRADER; KOBASISY, 2001; DE FELÍCIO et al., 2010; SUN; GUNG; SHIN, 2013; DE LA TORRE; PRIEGO-CAPOTE; DE CASTRO, 2015).

Culturas de linhagens de cianobactérias de *Aphanizomenon ovalisporum* e *Cylindrospermopsis raciborskii* provenientes de água doce também já exibiram a presença de neoftadieno, $[R-[R^*, R^*-(E)]- 3,7,11,15\text{-tetrametil-2-hexadeceno}]$, fitol e heptadecano (RÍOS et al., 2014)

Demais trabalhos da literatura já relataram a presença do hidrocarboneto heptadecano e do ácido tetradecanóico em cianobactérias (TELLEZ; SCHRADER; KOBASISY, 2001; COATES et al. 2014; LEA-SMITH et al., 2015).

Fatores como a morte espontânea das células e a presença de predadores no meio, podem aumentar a produção de hidrocarbonetos. Um fator ambiental interessante é que alcanos produzidos por cianobactérias alimentam outras bactérias presentes no ambiente, as quais podem se expandir rapidamente e consumir outros hidrocarbonetos, contribuindo assim com o ciclo de hidrocarbonetos dos oceanos. Além disto, essas bactérias consomem os hidrocarbonetos provenientes de derramamento de petróleo, os quais são prejudiciais e dessa forma, ajudam na conservação do meio (LEA-SMITH et al., 2015).

As estruturas encontradas na linhagens *Cyanobium* sp. CENA178, *Cyanobium* sp. CENA181 e *Oxynema* sp. CENA135 e descritas anteriormente podem ser vistas abaixo na Figura 16.

Figura 16. Estruturas das frações de baixa polaridade analisadas em CG-EM encontradas nas linhagens *Cyanobium* sp. CENA178, *Cyanobium* sp. CENA181 e *Oxynema* sp. CENA135

2.9 Avaliação das atividades biológicas dos extratos e frações

2.9.1 Avaliação da Atividade Antibacteriana

Para a atividade antibacteriana foram avaliados: extrato bruto de *Cyanobium* sp. CENA178 e fração (H+I); extratos brutos de *Cyanobium* sp. CENA181 e *Oxynema* sp. CENA135. Entretanto, nenhuma das amostras avaliadas foi ativa frente às bactérias testadas (item 2.7.1).

2.9.2 Avaliação da Atividade Antifúngica

Para a atividade antifúngica, citada no item 2.7.2, foram avaliados os extratos brutos de *Cyanobium* sp. CENA178, *Cyanobium* sp. CENA181 e *Oxynema* sp. CENA135, sendo que nenhum destes foi ativo frente às cepas utilizadas.

2.9.3 Avaliação da Atividade Antifúngica contra fungos fitopatogênicos

Foram testados os extratos brutos das linhagens *Cyanobium* sp. CENA178 e *Cyanobium* sp. CENA181, também não apresentou potencial positivo.

2.9.4 Avaliação da Atividade Anticolinesterásica

Foram avaliados os extratos brutos das linhagens *Cyanobium* sp. CENA178, o qual apresentou atividade moderada e *Cyanobium* sp. CENA181, com atividade fraca.

Devido a relatos em organismos marinhos de substâncias com atividade anticolinesterásica, como a substância oroidina isolada da esponja *Agelas oroides* e as pulmonarinas A e B provenientes da ascídia *Synoicum pulmonaria* (ORHAN et al., 2012; TADESSE et al., 2014) além da cianotoxina anatoxina-A, a qual apresentou atividade inibidora irreversível da acetilcolinesterase e é encontrada em cianobactérias (ARÁOZ; MOLGÓ; MARSAC, 2010), a continuidade deste estudo se mostra interessante, para verificar quais substâncias produziram a atividade nas amostras testadas, ainda que fraca e moderada, pois podem ter uma atuação diferente se em sinergismo e isoladas.

2.10 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos torna-se necessário adotar uma diferente metodologia de cultivo para o crescimento das linhagens de cianobactérias utilizadas, as quais não produziram os metabólitos secundários esperados. De acordo com as análises realizadas através de IV, RMN, CLAE-EM, pôde-se observar que os compostos eram muito polares e semelhantes o que dificultou a sua separação e identificação. Alguns dos dados obtidos através de RMN mostraram semelhanças com alguns aminoácidos como: valina, treonina e alanina.

Em contrapartida, os resultados obtidos por CG-EM acrescentam dados químicos de hidrocarbonetos às espécies estudadas e à flora brasileira, onde a linhagem *Cyanobium* sp. CENA178 a fração n-hexano/acetato de etila (9:1) apresentou os componentes: 2,4-bis (1,1-dimetiletil) fenol, (Z)-7-Hexadeceno; 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona e eicosano; a fração n-hexano da linhagem *Cyanobium* sp. CENA181 apresentou como componente majoritário o neoftadieno, o qual também foi encontrado na fração de acetato de etila da linhagem *Oxynema* sp. CENA135, esta apresentou como componentes majoritários o heptadecano, [R*,R*-(E)]- 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadeceno e octadecino.

Com relação à triagem biológica, o extrato bruto de *Cyanobium* sp. CENA178 e de *Cyanobium* sp. CENA181 apresentaram atividade anticolinesterásica moderada e fraca, respectivamente.

Os resultados obtidos neste trabalho trazem dados químicos e de atividades biológicas avaliados em linhagens de cianobactérias provenientes de manguezais, os quais contribuem para a linha de pesquisa e abrem espaço para novas investigações.

3. Capítulo II- Avaliação da interação química entre a linhagem de cianobactéria *Cyanobium* sp. CENA181 com o fungo endofítico marinho *Penicillium decaturense* por meio de co-cultura

3.1 INTRODUÇÃO

3.1.2 Fungos marinhos

A primeira definição do termo fungos marinhos ocorreu em 1979 por Kohlmeyer, onde ele diz que estes crescem e esporulam em ambiente marinho ou estuarino, sendo denominados de obrigatórios e fungos marinhos facultativos. Estes últimos são aqueles que crescem em ambientes de água doce ou terrestres e também podem crescer e esporular em ambientes marinhos (RATEB; EBEL, 2011; TARMAN; LINDEQUIST; MUNDT, 2013).

Os fungos são microrganismos eucariontes, com modo de vida saprófito, parasitário ou simbiótico, sendo não fotossintéticos. São classificados na sua grande maioria em Eucomicetos e subdivididos de acordo com a sua esporulação em Zigomicetos, Ascomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos (BLUNT; BUCKINGHAM; MUNRO, 2012).

De acordo com a sua distribuição, podem ser encontrados em ambientes terrestres e aquáticos, como mencionados anteriormente. São vistos em sedimentos marinhos, habitats de areia, solo e associados com invertebrados marinhos (esponjas, corais, ascídias) além de estarem em associação com plantas marinhas e microrganismos (RATEB; EBEL, 2011; BLUNT; BUCKINGHAM; MUNRO, 2012).

A maioria dos metabólitos secundários isolados de fungos é proveniente de associações com outros organismos, como algas (vermelhas, pardas e feófitas) e outras plantas marinhas (BLUNT; BUCKINGHAM; MUNRO, 2012).

Dentre as classes de PNM já isolados podem ser descritos: policetídeos, alcaloides, peptídeos, terpenos, derivados do chiquimato e lipídeos. Vários artigos mencionam os policetídeos como os compostos mais obtidos de fungos marinhos, seguidos por alcaloides, terpenos e peptídeos, na sua maioria produzidos pelos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* (RATEB; EBEL, 2011; DUARTE et al. 2012).

Metabólitos secundários derivados de fungos marinhos têm demonstrado importante atividade antiviral, anti-inflamatória, anticâncer e antibacteriana, como por exemplo a substância Fomolida A (**15**) do fungo *Phomopsis* sp. com atividade antimicrobiana; a substância Expansol A (**16**) do fungo *Penicillium expansum*, a qual possui atividade citotóxica e a substância didimellamida A (**17**), do fungo *Stagonosporopsis cucurbitacearum* com atividade antifúngica (Figura 17) (DUARTE et al. 2012; HAGA et al., 2013; TARMAN; LINDEQUIST; MUNDT, 2013; BLUNT et al., 2016).

Entre 2013 e 2014 houve um aumento na descoberta de novos PNM derivados de fungos, de 223 foram descobertos 318 (BLUNT et al., 2016).

Figura 17. Substâncias bioativas derivadas de fungos marinhos

3.1.3 O gênero *Penicillium* e seus metabólitos secundários bioativos

Uma das maiores descobertas de todos os tempos de antibióticos derivados de fungos foi a da penicilina isolada do fungo *Penicillium notatum*, descoberta por Alexander Fleming e comercializada desde a década 1940. Este fato provocou o aumento pela investigação de novos produtos biologicamente ativos com origem na natureza e também foi um marco para a medicina da época, a qual ficou conhecida como “A era dos antibióticos” (CRAGG; NEWMAN, 2013).

Pesquisas têm relatado que fungos do gênero *Penicillium* derivados do ambiente marinho têm-se mostrado uma fonte promissora de PNM, sendo responsáveis pela produção de 22% destes dentre os fungos, com estruturas inéditas e biologicamente ativas. As classes químicas reportadas são policetídeos, esteróis, alcaloides e terpenos, totalizando 58% de substâncias bioativas (MA et al, 2016).

Dentre os metabólitos secundários bioativos isolados do gênero *Penicillium* podem ser listados uma série deles, como por exemplo, 12-epoxi-7b,10aH,11bH-spiroax-4-eno-12-ona (**18**) que inibiu o crescimento de osteossarcomas humanos em ratos (ZHENG et al. 2014; BLUNT et al., 2016). A substância penicillipirona B (**19**) provocou a indução de quinona redutase em células de hepatoma de murídeo, indicando um papel preventivo do câncer (LIAO et al, 2014) e a substância herqueidiquetal (**20**), com atividade inibidora da enzima sortase A em *Staphylococcus aureus*, Figura 18 (JULIANTI et al., 2013).

Figura 18. Substâncias bioativas isoladas do gênero *Penicillium*

Além destas, a substância Cromanona A (**21**) isolada do fungo endofítico *Penicillium* sp. possui uma atividade sequestradora de OH, inibindo o citocromo P450 1A e atuando em enzimas com papel no desenvolvimento do câncer como GSH e GST, desempenhando um papel antitumoral (RATEB; EBEL, 2011; NICOLETTI; TRINCONE, 2016). Terretrione D (**22**) isolada do fungo endofítico *Penicillium* sp. CYE-87 apresentou atividade antifúngica e antiimigratória em células de tumor de mama (SHAALA; YOUSSEF, 2015). Demonstrando atividade antimicrobianda, Penicibrocazina B (**23**), foi isolada dentre uma série de novas

dicetopiperazinas sulfatadas do fungo endofítico marinho *Penicillium brocae*, Figura 19 (MENG et al., 2015).

Figura 19. Substâncias com atividade antitumoral e antibacteriana

Cromanona A

21

Terretriona D

22

Penicibrocazina B

23

A espécie *Penicillium adametzioides* AS-53 produziu a substância adametizina A (**24**), a qual foi ativa contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas hydrophilia*, *Vibrio* spp. *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, e *Gaeumannomyces graminis* (LIU et al., 2015). O fungo endofítico *Penicillium chermesinum* EN-480 isolado da alga marinha *Pterocladia tenuis* produziu quatro novos espiroterpenoides denominados de quermesinas A-D, sendo que quermesinas A (**25**) e B (**26**) foram ativas contra a bactéria *Micrococcus luteus*, Figura 20 (LIU et al., 2016).

Figura 20. Substâncias isoladas do gênero *Penicillium* ativas contra bactérias

Adametizine A

24

Quermesina A

25

Quermesina B

26

3.1.4 Co-cultura entre cianobactéria e fungo

Substâncias que seriam produzidas por microrganismos em seu hábitat natural, podem não ser produzidas quando cultivadas em laboratório, como já mencionado no capítulo anterior. Dentre os métodos utilizados para ativar as vias biossintéticas silenciosas e assim, estimular a produção de substâncias, a co-cultura de dois ou mais microrganismos inspirados em associações presentes na natureza está sendo explorada para obtenção de novos metabólitos e também como um meio de avaliar a interação entre os microrganismos (BERTRAND et al., 2014).

Algumas substâncias bioativas foram isoladas de co-culturas entre fungos, como a substância oosponol (**27**), isolada da interação entre os fungos *Gloeophyllum abietinum* e *Heterobasidion annosum*, com atividade antibacteriana. Também foi isolada da interação entre os fungos *Alternaria tenuissima* e *Nigrospora sphaerica* com atividade antifúngica a substância stemfiperilenol (**28**). Além da co-cultura entre fungos foi observada interação entre o fungo *Aspergillus fumigatus* e a bactéria *Streptomyces peucetius*, onde foi isolada a fumiformida A (**29**) com atividade citotóxica, Figura 21 (BERTRAND et al., 2014).

Figura 21. Susbtâncias com atividade antimicrobiana e citotóxica isoladas de co-cultura entre microrganismos

Além dessas interações citadas anteriormente também estão sendo estudadas co-culturas entre cianobactérias e fungos, as quais na natureza podem viver em sistema de simbiose em associações mutualísticas chamadas líquens.

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

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

A interação de cianobactérias e fungos pode ser evidenciada em alguns estudos que notaram a produção de novos polissacarídeos a partir da interação de ambos, com predominância na produção de metabólitos pelos fungos (ANGELIS et al., 2012; WREDE et al., 2014).

Um estudo muito interessante relatou que o fungo *Trichoderma citrinoviride*, isolado de floração de cianobactéria *Microcystis* em deterioração foi cultivado em laboratório em co-cultura com a espécie de cianobactéria *Microcystis aeruginosa* e foi capaz de inibir o crescimento da mesma, bem como a produção de microcistinas, que são substâncias potencialmente tóxicas quando ocorrem as florações. Este dado é muito interessante para controle de florações e degradação de toxinas, sendo uma possível alternativa a ser testada, já que relatos de fungos como algicidas ainda é bastante inexplorado (MOHAMED; HASHEM; ALAMRI, 2014).

Sendo assim, de acordo com os interessantes relatos descritos, propusemos neste projeto realizar uma co-cultura entre a linhagem de cianobactéria *Cyanobium* sp. CENA181 e o fungo endofítico de alga marinha *Penicillium decaturense*, com a finalidade de observar a interação química entre esses dois microrganismos, a fim

de verificar se houve produção de novos metabólitos secundários, que não seriam produzidos na ausência de estímulos.

O fungo *P. decaturense* já foi estudado em nosso laboratório pelo Dr. Rafael de Felício (2014), e por esta razão, este fungo foi escolhido para ser eliciado com a linhagem *Cyanobium* sp. CENA181 que foi estudada neste trabalho.

3.2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo avaliar a interação química entre a linhagem de cianobactéria *Cyanobium* sp. CENA181 e o fungo endofítico marinho *Penicillium decaturense* através de co-cultura visando à produção de metabólitos secundários.

3.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Realizar co-cultura com a linhagem de cianobactéria *Cyanobium* sp. CENA181 e o fungo *Penicillium decaturense*;
- ✓ Realizar a triagem química (CCDC, CLAE, CLAE-EM, RMN de ^1H) dos extratos e frações obtidas da co-cultura;
- ✓ Proceder ao isolamento e à elucidação estrutural dos constituintes majoritários obtidos.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Material e equipamentos utilizados

Solventes

- ✓ Foram utilizados os mesmos materiais do item 2.3.1.

Meios de cultivo

- ✓ Meio SWBG-11 (Sea water BG-11)
- ✓ Meio PDB (Potato Dextrose Borth): (Infusão de batata (200,0 g/L), dextrose (20,0 g/L) – Acumedia®, água do mar natural.

Equipamentos

- ✓ Centrífuga da marca Hitashi® modelo CR22GII;
- ✓ Fluxo laminar esterilizado – Pachane, Autoclave vertical - PHOENIX;
- ✓ Evaporador rotativo da marca Buchi®, modelo R-210;
- ✓ Cromatógrafo da marca Shimadzu®, modelo SCL-10AVP, com detector de arranjo de diodos modelo SDP-M10AVP;
- ✓ Espectrômetro de massas da marca Bruker, modelo micrOTOF II com fonte de ionização em elétron-spray (ESI), com analisador quadrupolo do tipo tempo de voo (TOF), Calibrante: NaTFA;
- ✓ Espectrômetro de massas micrOTOF II (Bruker Daltonics) equipado com analisador por Tempo de voo – TOF; Calibrante: NaTFA;
- ✓ Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear, equipamento de RMN da marca Bruker, modelo DRX 500 (500 MHz),
- ✓ Coluna analítica Shim-pack C8 (250 x 4,6mm x 5 µm– Shimadzu®);
- ✓ Coluna semi-preparativa Shim-pack C8 (250 x 20mm, Shimadzu®)

3.3.2 Obtenção da cultura do fungo *Penicillium decaturense*

A linhagem do fungo endofítico *P. decaturense* foi isolada da alga marinha *Bostrychia tenella* (J.V. Lamouroux) J. Agardh em trabalhos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa (DE FELÍCIO, 2010) e está sendo mantido no Laboratório de Química Orgânica do Ambiente Marinho (NPPNS) - FCFRP-USP, junto com a coleção de linhagens de fungos endofíticos. Esta linhagem encontra-se preservada de dois modos: em água, segundo CASTELANI (1963) e em óleo mineral, segundo ARAÚJO e colaboradores (2002).

Para reativação da linhagem microbiana, as amostras preservadas em óleo mineral foram transferidas para placa de Petri com meio sólido PDB. As placas foram mantidas a 25 °C até o crescimento do microrganismo (15-30 dias) por toda a placa de Petri. Após esse período, foram transferidos 10 plugs do fungo *P. decaturense* para três frascos tipo Erlenmeyer com os meios de cultura. Todos estes procedimentos envolvendo a manipulação do microrganismo foram realizados em capela de fluxo laminar e com material esterilizado, e os meios de cultura foram preparados com água do mar.

3.3.3 Co-cultura da linhagem de cianobactéria *Cyanobium* sp. CENA181 e do fungo endofítico de alga marinha *Penicillium decaturense*

A co-cultura foi realizada em dois meios distintos para avaliar como cada microrganismo interferiria no ambiente do outro, os meios podem ser vistos na Figura 22.

Um dos meios escolhidos foi o SWBG-11, onde são mantidas as culturas de cianobactérias e foi selecionada a linhagem de cianobactéria *Cyanobium* sp. CENA181. Foram realizados experimentos em triplicata, onde utilizaram-se três frascos do tipo Erlenmeyer de 250 mL para cada experimento, como descrito abaixo:

- ✓ Experimento 1: linhagem de cianobactéria *Cyanobium* sp. CENA181;
- ✓ Experimento 2: fungo *P. decaturense*;
- ✓ Experimento 3: linhagem de cianobactéria *Cyanobium* sp. CENA181 e somente no terceiro dia de crescimento foi acrescentado a este meio o fungo *P. decaturense*.

Outro meio escolhido foi o PDB, o qual foi utilizado para o cultivo do fungo *P. decaturense* e no terceiro dia de cultivo, foi acrescentado a este meio 25 mL do meio da espécie *Cyanobium* sp. CENA181. Foi feito um cultivo com três frascos do tipo Erlenmeyer de 250 mL, onde estes continham:

- ✓ Experimento 1: linhagem de cianobactéria *Cyanobium* sp. CENA181;
- ✓ Experimento 2: fungo *P. decaturense*;
- ✓ Experimento 3: fungo *P. decaturense* e somente no terceiro dia de cultivo foi acrescentada ao meio a linhagem de cianobactéria *Cyanobium* sp. CENA181.

Juntamente, com este experimento foram preparados frascos do tipo Erlenmeyer com os controles (meio SWBG-11 e meio PDB).

Figura 22. Co-cultura de *Cyanobium* sp. CENA181 e fungo *Penicillium decaturense*, em meio SWBG-11 (A) e PDB (B), no período de 21 dias. Fonte: o Autor)

As culturas foram avaliadas no período de sete e 21 dias. Em cada período foi realizada a extração e obtenção dos extratos brutos, descritos a seguir.

3.3.4 Extração e isolamento dos extratos brutos obtidos da co-cultura da linhagem de cianobactéria *Cyanobium* sp. CENA181 e do fungo endofítico de alga marinha *Penicillium decaturense*

Para a obtenção dos extratos em meio SWBG-11, as amostras foram centrifugadas e depois extraídas com diclorometano:metanol (2:1) três vezes sob agitação e 5 min em sonicação. A seguir, as amostras foram concentradas em rotaevaporador à temperatura de 35 °C. As massas obtidas estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6- Rendimento dos extratos brutos obtidos de cultura isolada e cultura mista da linhagem *Cyanobium* sp. CENA181 e do fungo *Penicillium decaturense* em meio SWBG-11

Meio SWBG-11	7 dias	21 dias
<i>Cyanobium</i> sp.CENA181	486,51 mg	368,70 mg
<i>Penicillium decaturense</i>	168,30 mg	280,60 mg
<i>Cyanobium</i> sp. CENA181+ <i>P. decaturense</i>	1.094,50 mg	1.931,90 mg

A extração orgânica para a obtenção dos extratos do meio PDB foi feita da seguinte maneira: foram adicionados 100 mL da mistura de diclorometano:metanol (2:1) a cada frasco tipo Erlenmeyer. Após 24 h, os micélios foram macerados novamente com acetato de etila (100 mL), com subsequente separação de fase,

sendo a fase aquosa devidamente descartada ao final da extração. Os extratos foram concentrados à pressão reduzida com temperatura máxima do banho de 40 °C, as massas obtidas estão na Tabela 7.

Foi realizada uma partição líquido-líquido com n-hexano, com o objetivo de remover ácidos graxos.

Os extratos brutos obtidos foram injetados em CLAE-DAD. Fase móvel: ACN:H₂O. Gradiente: 0-40 min (3 a 100% de ACN); 40-50 min (100% de ACN); 50-55 min (100% de H₂O); 55-60 min (100% de H₂O) (v/v). Vazão: 1 mL/min. Foi utilizada coluna analítica da marca Shimadzu® (Shim-pack LC8 25 cm x 4,6mm x 5 µm).

Tabela 7- Rendimento dos extratos brutos obtidos de cultura isolada e cultura mista da linhagem *Cyanobium* sp. CENA181 e do fungo *Penicillium decaturense*, em meio PDB

Meio PDB	7 dias	21 dias
<i>Cyanobium</i> sp. CENA181	988,60 mg	1.672,20 mg
<i>Penicillium decaturense</i>	384,40 mg	264,10 mg
<i>Cyanobium</i> sp. CENA181+ <i>P. decaturense</i>	166,50 mg	376,00 mg

O extrato bruto em meio PDB (21 dias) contendo o fungo endofítico *P. decaturense* e o extrato bruto contendo a co-cultura do fungo e da linhagem de cianobactéria *Cyanobium* sp. CENA181 foram escolhidos de acordo com o perfis cromatográficos que serão apresentados nos resultados.

A seguir foram injetados separadamente em CLAE-DAD em coluna semi-preparativa. Fase móvel: ACN:H₂O. Gradiente: 0-40 min (3 a 80% de ACN); 45-50 min (100% de ACN); 55-60 min (80% de ACN) (v/v). Vazão: 9 mL/min. A coluna utilizada foi da marca Shimadzu® (Shim-pack LC8 250 x 20 mm x 5 µm).

As subfrações obtidas da injeção dos extratos brutos foram reinjetadas para avaliação do perfil cromatográfico em coluna analítica da marca Shimadzu® (Shim-pack LC8 250 x 4,6mm x 5 µm). Fase móvel: ACN:H₂O. Gradiente: 0-40 min (3 a 80% de ACN); 40-50 min (100% de ACN); 50-55 min (80% de ACN); 55-60 min (3% de H₂O) (v/v). Vazão: 1 mL/min.

A partir dessas análises foram selecionadas as substâncias majoritárias obtidas do extrato bruto do fungo *P. decaturense*, LAT67_7 (1,5 mg) e da co-cultura

a substância LACCP_8 (0,9 mg), os dados cromatográficos e de RMN serão discutidos a seguir.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Avaliação do perfil químico dos extratos brutos da linhagem *Cyanobium* sp. CENA181, do fungo *Penicillium decaturense*, e da co-cultura de cianobactéria *Cyanobium* sp. CENA181 e fungo *Penicillium decaturense* em meio SWBG-11 e PDB

Os cromatogramas obtidos são mostrados abaixo, bem como a escolha dos extratos brutos que tiveram seus perfis químicos mais interessantes para dar prosseguimento na investigação dos metabólitos secundários.

Em meio SWBG-11, na Figura 23, podem ser observados os cromatogramas dos períodos de cultivo de sete (A) e 21 (B) dias, onde foram evidenciados picos até 10 minutos, no meio de cultura da linhagem CENA181.

Figura 23. Cromatogramas obtidos da análise em CLAE-DAD em meio SWBG-11. A: Cultivo de sete dias. Linha azul: fungo *Penicillium decaturense*; Linha preta: linhagem *Cyanobium* sp. CENA181; Linha vermelha: co-cultura entre ambos os microrganismos. B: Cultivo de 21 dias. Linha azul: fungo *Penicillium decaturense*; Linha vermelha: linhagem *Cyanobium* sp. CENA181; Linha preta: co-cultura. UV= 208 nm

Com relação ao meio PDB do fungo (Figura 24), pôde ser observado que no período de sete dias a maioria dos picos estão sobrepostos. O período de 21 dias (Figura 24) mostrou-se mais interessante devido ao perfil químico, onde foram observados picos na co-cultura que não foram vistos no meio em que cresceu o fungo. De acordo com o cromatograma apresentado na Figura 24-B foi possível observar picos no extrato bruto da co-cultura que não estavam presentes no extrato bruto do fungo, o que indica que a produção dessas substâncias foram estimuladas pela adição da cianobactéria ao meio de cultura.

Dessa forma, foi dado prosseguimento ao estudo dos extratos brutos do fungo *P. decaturense* e da co-cultura do fungo *P. decaturense* e da linhagem *Cyanobium* sp. CENA181 com cultivo em vinte e um dias.

Figura 24. Cromatogramas obtidos da análise em CLAE-DAD em meio PDB. A: Cultivo de sete dias. Linha vermelha: fungo *Penicillium decaturense*; Linha verde: linhagem *Cyanobium* sp. CENA181; Linha azul: co-cultura entre ambos os microrganismos; Linha preta: meio controle PDB. B: Cultivo de 21 dias. Linha azul: fungo *Penicillium decaturense*; Linha rosa: linhagem *Cyanobium* sp. CENA181; Linha preta: co-cultura. UV= 254 nm. As setas pretas indicam as substâncias observadas somente na co-cultura.

Foram obtidos os cromatogramas de íons totais CLAE-EM dos extratos brutos do fungo *Penicillium decaturense* e da co-cultura entre o fungo *P. decaturense* e a

linhagem CENA181, ambos em meio PBD (Anexo A-Figuras 57 e 58). As massas (m/z) encontradas em mod e o tempo de retenção (t_R) min de cada pico encontram-se na tabela 8 e, em negrito as massas que foram consideradas semelhantes nos dois extratos brutos, porém não se pode afirmar que são as mesmas substâncias sem um estudo mais aprofundado, pois podem ser substâncias análogas. Pôde-se observar um número maior de substâncias presentes no extrato bruto do fungo.

Tabela 8- Perfil químico geral dos valores de massas (m/z) encontrados no extrato bruto do fungo *Penicillium decaturense* e da co-cultura da linhagem *Cyanobium* sp. CENA181 e de *P. decaturense*, em meio PDB

Extrato bruto do fungo <i>P. decaturense</i>				Extrato bruto da co-cultura de <i>P. decaturense</i> e <i>Cyanobium</i> sp. CENA181			
Massa (Pos) m/z	(t_R) min	Massa (Neg) m/z	(t_R) min	Massa (Pos) m/z	(t_R) min	Massa (Neg) m/z	(t_R) min
144,1018	6,0	130,8863	3,0	267,0738	6,2	265,0690	4,0
162,1112	7,8	267,0834	5,0	273,0703	4,1	279,2290	49,0
195,8984	3,0	279,2290	49,0	283,1067	8,0	281,0627	3,8
268,1030	6,8	281,0617	4,0	301,1393	46,0	281,2425	51,0
273,0719	4,1	281,2451	50,0	315,1169	26,8	291,1187	27,0
301,1365	46,0	289,1037	24,0	322,1485	19,5	421,1053	16,0
313,1011	24,0	421,1053	16,5	330,1992	24,0	545,3022	49,0
331,1113	16,0	457,1811	18,2	331,1098	26,0		
345,1255	25,0	-		345,1250	24,5	-	
413,2579	53,8	-		413,2612	51,8	-	
427,2047	24,0	-		457,2720	43,0	-	
454,1750	37,0	-		-		-	
457,2672	43,8	-		-		-	
483,1554	28,7	-		-		-	

*Os valores de m/z em negrito apareceram nos dois extratos

Por meio do *screening* realizado com os extratos brutos do fungo e da co-cultura (Anexo A-Figuras 56 e 57) foi possível notar diferenças e semelhanças de valores de m/z , todos esses valores foram comparados com o meio PDB que também foi analisado, após esta análise foram selecionados os valores de m/z somente pertencentes aos extratos brutos e não ao branco do meio.

3.4.2 Obtenção da substância do extrato bruto do fungo LAT67_7 e da substância do extrato bruto da co-cultura LACCP_8

As substâncias LAT67_7 ($t_R = 47,0$ min) e LACCP_8 ($t_R = 48,0$ min), foram obtidas através de análise semi-preparativa descrita no item 3.3.4 (Figura 25).

Na Figura 25-A, é representado o cromatograma do extrato bruto do fungo, onde a substância isolada (LAT67_7) aparece em destaque com a flecha branca. Na Figura 25-B é representada a substância isolada (LACCP_8) do extrato bruto da co-cultura.

Figura 25. Cromatogramas obtidos da análise em CLAE-DAD em meio PDB, análise semi-preparativa. A: Extrato bruto do fungo *Penicillium decaturense*. B: Extrato bruto do co-cultivo do fungo *Penicillium decaturense* e da linhagem *Cyanobium* sp. CENA181. UV= 281 nm

Todos os picos que apareceram no cromatograma da Figura 25 foram coletados, estes foram reinjetados em fase analítica e dessa forma, foram selecionadas as amostras para determinação estrutural através de espectrometria de massas e RMN.

3.4.2.1 Determinação da substância 10,11 deidrocurvularina

Por meio do cromatograma abaixo (Figura 26) foi possível verificar a presença de dois picos, a amostra foi analisada em CLAE-EM/EM e também em RMN, sendo possível determinar a estrutura da substância majoritária (t_R = 26,0 min). O código desta amostra é LAT67_7 e a estrutura foi determinada quimicamente como sendo a 10,11-deidrocurvularina (Figura 27).

Figura 26. Cromatograma da substância LAT67_7. Fase móvel: ACN e H₂O. Gradiente: 0-40 min (3 a 80% de ACN); 40-50 min (100% de ACN); 50-55 min (80% de ACN); 55-60 min (3% de H₂O) (v/v). Vazão: 1,0 mL/min. UV= 254 nm

O RMN de ¹H (Anexo A- Figuras 58 e 59) apresentou algumas impurezas e também alguns sinais minoritários pertencentes à outras substâncias presentes na amostra, através dos sinais claramente majoritários foi possível determinar o metabólito isolado. Os dados de carbono foram correlacionados com o de hidrogênio por meio de HMQC e HMBC (Anexo A- Figuras 61 e 62).

Deslocamentos químicos de carbonos pertencentes ao anel aromático tetra-substituído foram reconhecidos por meio de quatro carbonos quaternários. Dois destes com deslocamentos químicos em δ 160,6 e δ 160,9 estão ligados a grupos hidroxílicos. Analisando o espectro bidimensional HMBC (Anexo A-Figura 62) foi possível observar as correlações com os hidrogênios do anel em δ 6,29 (d; 1H; 2,2 Hz) e δ 6,25 (d; 1H; 2,2 Hz), estes ligados a C-4 (δ 111,7) e C-6 (δ 102,3).

O HMBC mostrou a correlação entre C-6 e C-8. Os outros dois carbonos quaternários do anel foram identificados em C-3 (δ 135,6) e C-8 (δ 116,4), estes se fundem ao anel macrocíclico. Dois dupletos em δ 3,45 (1H; 16,6 Hz) e δ 3,73 (1H; 16,6 Hz) estão em acoplamento geminal, correlacionados por COSY (Anexo A-Figura 60) e ligados a C-2 (δ 42,0), são vizinhos à carbonila de éster (δ 171,5). O

deslocamento químico em C-15 (δ 73,9) ligado à H (δ 4,82), foi correlacionado também à carbonila do éster e a um grupamento metílico C-16 (δ 19,9) e três hidrogênios 1,19 (d), os dados podem ser observados no (Anexo A-Figura 61 e 62).

Nas posições de C-12, C-13 e C-14 (δ 33,8; δ 25,0 e δ 34,8) constatou-se a presença de uma sequência de hidrogênios metilênicos (δ 1,59-2,40), onde as correlações foram verificadas por meio de COSY (Anexo A-Figura 60). Através do HMBC (Anexo A-Figura 62) foi possível observar a correlação entre o C-12 e os carbonos vinílicos C-10 (δ 132,9) e C-11 (δ 153,9), os quais estão conectados aos hidrogênios δ 6,51 (d; 1H; 15,6 Hz) e δ 6,59 (m; 1H), respectivamente e o valor de $J=15,6$ Hz, pode indicar uma configuração *trans*. Essa posição da dupla encontra-se mais desblindada possivelmente pela proximidade com a carbonila do C-9 (δ 198,6).

Os deslocamentos químicos observados para a substância 10,11-deidrocurvularina podem ser vistos na Tabela 9.

Figura 27. Estrutura da substância 10,11- deidrocurvularina e as correlações observadas no mapa de contorno HMBC

Tabela 9. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 10,11-deidrocurvularina, em CD_3OD , comparados com dados da literatura

C	δ_{H} (mult; H, J (Hz)) ^a	δ_{H} (mult; H, J (Hz)) ^b	δ_{C} ^a	δ_{C} ^b
1	-	-	171,5 (Cq)	162,2 (Cq)
2	3,45 (d; 1H; 16,6) 3,73 (d; H; 16,6)	3,44 (d; 1H; 16,7) 3,72 (d; 1H; 16,7)	42,0	42,4
3	-	-	135,6 (Cq)	137,0 (Cq)
4	6,29 (d; 1H; 2,2)	6,28 (d; 1; 2,0)	111,7	112,2
5	-	-	160,9 (Cq)	162,0 (Cq)
6	6,25 (d; 1H; 2,2)	6,24 (d; 1H; 2,0)	102,3	102,8
7	-	-	160,6 (Cq)	162,2
8	-	-	116,4 (Cq)	117,8
9	-	-	198,6 (Cq)	200,0 (Cq)
10	6,51 (d; 1H; 15,6)	6,49 (d; 1H; 15,4)	132,9	133,3
11	6,59 (m; 1H)	6,57 (ddd; 1H; 8,2; 15,4 ; 5,6)	153,9	154,3
12	2,40 (m; 1H) 2,32 (m; 1H)	2,38 (m; 1H) 2,29 (m; 1H)	33,8	34,2
13	2,00 (m; 1H) 1,98 (m-1H)	1,96 (m; 1H) 1,85 (m; 1H)	25,0	25,4
14	1,59 (m-1H) 1,85 (dd; 1H; 10,0)	1,58 (m; 1H) 1,96 (m; 1H)	34,8	35,1
15	4,82 (m; 1H)	4,79 (m; 1H)	73,9	74,3
16	1,19 (d; 3H; 6,4)	1,18 (d; 6,6 ; 3H)	19,9	20,3

^a Dados experimentais; ^b Dados da literatura (AH et al., 2010). Os deslocamentos químicos de ^{13}C foram obtidos através das correlações de HMQC e HMBC.

No espectro de massas em modo positivo (Anexo A-Figura 63) foi observada um valor de m/z 291,1201 $[\text{M}+\text{H}]^+$ e em modo negativo (Anexo A-Figura 64) o valor de m/z 289,1113 $[\text{M}-\text{H}]^-$, sendo assim foi realizado um levantamento de dados onde

a substância 10,11-deidrocurvularina (**30**) (Figura 27) teve correspondência no valor de m/z e nos deslocamentos químicos de RMN.

O metabólito isolado apresentou fórmula molecular ($C_{16}H_{18}O_5$, calculada para m/z 291,1227, erro= 8,9 ppm) e o UV da substância observado no cromatograma foi de 254 nm.

3.4.2.2 Determinação da substância curvularina

O cromatograma abaixo (Figura 28) apresentou um pico majoritário (t_R = 28,0 min), e por meio de RMN foi possível determinar a substância majoritária, conhecida como curvularina (Figura 29). O código interno da amostra é LACCP_8.

Figura 28. Cromatograma da substância LACCP_8. Fase móvel: ACN e H_2O . Gradiente: 0-40 min (3 a 80% de ACN); 40-50 min (100% de ACN); 50-55 min (80% de ACN); 55-60 min (3% de H_2O) (v/v). Vazão: 1,0 mL/min. UV= 254 nm

Foram observados por meio de HMQC (Anexo A-Figura 68) os deslocamentos químicos pertencentes ao anel aromático em C-4 e C-6 (δ 111,9 e δ 102,3) ligados a H (δ 6,22 e δ 6,25), respectivamente. Ainda com relação aos carbonos do anel, os sinais em C-3 e C-8 (δ 136,0 e δ 119,3) são dos carbonos quaternários que se fundem com o macrociclo, observados no HMBC (Anexo A-Figura 69). Infelizmente não foi possível observar os deslocamentos químicos dos carbonos que contém as hidroxilas no anel. Por meio do HMBC foi possível correlacionar C-4, C-6 e C-8. Por meio de COSY (Anexo A-Figura 67) foi possível verificar que os deslocamentos químicos em δ 3,62 (d; 1H; 15,8 Hz) e δ 3,87 (d; 1H; 15,8 Hz) são acoplados e por meio de HMQC ligados a C-2 (δ 39,8), também foi possível correlacionar através de HMBC a ligação com o carbono da carbonila de éster C-1 (δ 171,5) e com os carbonos quaternários C-3 e C-9 (Anexo A-Figuras 68 e 69).

O deslocamento químico na posição C-15 (δ 73,3) ligado à H (δ 4,92) através do COSY se correlacionou aos hidrogênios da metila em H-16 (δ 1,13) e ao H-14a (δ 1,45). Através do COSY também foi possível verificar as correlações entre grupos metilênicos de H-11 a H-14, Figura 46.

Não foi observada a presença de dupla ligação como no espectro da substância anterior isolada do fungo. No C-10 (δ 44,1) foram observados dois hidrogênios com deslocamentos químicos diferentes H-10a (δ 2,74), onde pode ser visto um duplo duplo duplete e em H-10b (δ 3,21; m; 1H), a partir destes sinais pode-se inferir que há a presença da carbonila próxima ao anel (Anexo A-Figuras 65 e 66).

Por meio dos dados encontrados nas análises de RMN abaixo em 1-D e 2-D (Anexo A-Figuras 65-69), sugere-se que a substância encontrada na co-cultura é a curvularina (Figura 29), já isolada de várias espécies de fungos, incluindo o gênero *Penicillium*.

Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C para a curvularina podem ser vistos na tabela 10.

Figura 29. Estrutura da substância curvularina e as correlações dos espectros de 2-D

Tabela 10. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância curvularina, em CD_3OD , comparados com dados da literatura

C	δ_{H} (mult; H, J (Hz))^a	δ_{H} (mult; H, J (Hz))^b	δ_{C}^a	δ_{C}^b
1	-	-	171,5 (Cq)	172,8 (Cq)
2	3,62 (d; 1H; 15,8) 3,87 (d; 1H, 15,8)	3,69 (d; 1H; 15,7) 3,77 (d; 1H; 15,7)	39,8	40,5
3	-	-	136,0 (Cq)	137,2 (Cq)
4	6,22 (d; 1H; 2,1)	6,33 (d; 2,3 Hz)	111,9	112,2
5	-	-	NO	161,2
6	6, 25 (d; 1H;2,1)	6,37 (d; 1H; 2,3)	101,3	102,7
7	-	-	NO	159,5
8	-	-	119,3 (Cq)	120,9 (Cq)
9	-	-	NO	209,7 (Cq)
10	2,74 (ddd, 1H; 2, 5;9,7; 15,1) 3,21 (m; 1H)	2,75 (ddd; 1H; 2,9; 9,7; 15,4) 3,10 (ddd; 1H; 3,0; 8,7; 15,4)	44,1	44,7
11	1,58 (m, 1H) 1,75 (m; 1H)	1,52 (m; 1H) 1,73 (m; 1H)	23,5	23,9
12	1,25 (m; 1H) 1,40 (m,1H)	1,25 (m; 1H) 1,41 (m; 1H)	27,2	27,7
13	1,29 (m; 1H) 1,43 (m, 1H)	1,28 (m;1H) 1,45 (m;1H)	24,5	24,9
14	1,45 (m; 1H) 1,58 (m; 1H)	1,43 (m;1H) 1,58 (m,1H)	32,5	33,0
15	4,92 (m; 1H)	4,90 (m; 1H)	73,3	73,8
16	1,13 (d; 3H; 6,8)	1,10 (d; 1H; 6,4)	19,97	20,5

^a Dados experimentais; ^b Dados da literatura (GHISALBERTI; HOCKLESS; ROWLAND; WHITE, 1993). Os deslocamentos químicos de ^{13}C foram obtidos através das correlações de HMQC e HMBC.

A fórmula molecular proposta para a curvularina é ($C_{16}H_{20}O_5$) e sua estrutura pode ser vista na Figura 29. O valor da banda observada no espectro de absorção na região do UV da substância selecionado no cromatograma é de 254 nm.

Os dados obtidos a partir de infusão direta para esta amostra foram inconclusivos. Nos dados dos cromatogramas de íons totais do extrato bruto da co-cultura foi possível observar no modo positivo (Tabela 8, p. 50) o valor de m/z 315,1169 $[M+Na]^+$ e em modo negativo m/z 291,1187 $[M-H]^-$, através desses valores sugere-se a presença da substância curvularina (Anexo A-Figuras 56 e 57). Esses resultados foram relevantes, pois a substância foi isolada diretamente do extrato bruto. Estes valores não foram observados no extrato bruto do fungo *P. decaturense*, somente na co-cultura, o que considera-se que a substância foi produzida pelo fungo devido à presença da cianobactéria no meio de cultivo.

Os valores ampliados dos espectros de massas nos valores selecionados em modo positivo m/z 315,1171 $[M+Na]^+$, pico em 26,7 min e modo negativo m/z 291,1185 $[M-H]^-$, pico em 27,0 min podem ser visto no Anexo A, (Anexo A-Figuras 70 e 71). Através desses valores foi realizado uma busca nos bancos de dados e artigos com o valor m/z 292,0. Os dados que tiveram compatibilidade com o RMN foram o da substância curvularina (**31**), Figura 29. A curvularina foi encontrada por outros autores que também isolaram a substância 10,11-deidrocurvularina de fungos, esses resultados serão comentados adiante.

As curvularinas são lactonas macrocíclicas pertencentes à classe das lactonas do ácido diidróxifenilacético, as quais apresentam um anel aromático ligado à lactona macrocíclica. A substância 10,11-deidrocurvularina (**30**) e a curvularina (**31**) possuem semelhanças estruturais com classes policetídicas de lactonas ácido resorcílicas, como o radicicol (**32**) e zearalenone (**33**) (GREVE et al., 2008; XU et al., 2014).

10,11-deidrocurvularina

30

curvularina

31

radicicol

32

zearalenone

33

As curvularinas e seus derivados são metabólitos secundários produzidos por uma variedades de fungos como, por exemplo, dos gêneros *Penicillium*, *Curvularia*, *Aspergillus* e *Alternaria*. As curvularinas e derivados vêm demonstrando uma série de atividades biológicas, tais como: citotoxicidade, inibição da divisão celular, atividade antifúngica, antibacteriana, fitotoxicidade, anti-inflamatória (ZHAN; GUNATILAKA, 2005; GREVE et al., 2008; DAI et al., 2010; SCHMIDT et al., 2012; XU et al., 2013; XU et al., 2014; TILLOTSON et al., 2016).

Ambas as substâncias (curvularina e 10,11-deidrocurvularina) são fitotoxinas fúngicas (ROBESON; STROBEL, 1981; XU et al., 2013; XU et al., 2014). Estas substâncias tiveram relatos de atividades citotóxicas em diferentes linhagens celulares de tumores A549 (carcinoma de pulmão), HeLa (câncer cervical), MCF-7 (tumor de mama), MDA-MB-231 (adenocarcinoma mamário) e somente a substância 10,11-deidrocurvularina foi citotóxica em COLO 205 (câncer de cólon) e foram isoladas do fungo *Chrysosporium lobatum* (KUMAR et al., 2013).

Em outro estudo foram testadas linhagens celulares de Du145 (tumor de próstata), HeLa, Huh 7 (hepatocarcinoma), MCF-7, NCI-H460 (câncer de pulmão), SGC-7901 (câncer gástrico) e SW1990 (câncer de pâncreas), onde somente a substância 10,11-deidrocurvularina apresentou citotoxicidade (MENG et al., 2013), contrastando com Kumar et al. (2013), no qual a curvularina foi ativa em HeLa e MCF-7. Outros estudo mostrando a citotoxicade da curvularina e 10,11

deidrocurvularina, mostrou que ambas são ativas em linhagens de células L5178Y (linfoma) com valores de 16,0 e 1,4 μ M, respectivamente (AH et al., 2010).

A substância curvularina apresentou atividade anti-inflamatória em doenças inflamatórias crônicas, como artrite reumatóide (SCHMIDT et al., 2012)

A substância 10,11-deidrocurvularina também foi isolada anteriormente do fungo *P. decaturense* durante o doutorado do Dr. Rafael de Felício (2014), sendo que o resultado encontrado para este extrato foi o mesmo.

De acordo com os dados analisados a substância 10,11-deidrocurvularina estava presente somente no extrato bruto do fungo. A substância curvularina foi o pico (t_R = 48,0 min) observado somente no extrato bruto da co-cultura (Figura 25-B, p. 51), sendo um produto da co-cultura entre o fungo *P. decaturense* e a linhagem da cianobactéria *Cyanobium* sp. CENA181. Não se pode afirmar que o pico anterior (Figura 25-B, p. 51) ao isolado da co-cultura seja a substância 10,11-deidrocurvularina somente pela semelhança do cromatograma com o extrato bruto do fungo, pois de acordo com os espectros de massas seu valor de m/z não foi observado na co-cultura e também não foi isolado em quantidade suficiente para ser analisado.

A partir dos resultados expostos, observou-se que após a adição da cianobactéria houve interação química e ecológica entre os microrganismos avaliados, estes dados foram evidenciados através dos cromatogramas e dos espectros de massas dos extratos brutos, onde foi possível visualizar valores de m/z produzidos somente pelo fungo e outros somente pela co-cultura. Um dos metabólitos secundários identificados produzidos apenas pelo co-cultivo foi a substância curvularina.

Outras substâncias foram isoladas, porém devido à quantidade de amostra a identificação não foi possível, pois as amostras foram isoladas em pequena escala. Sendo assim, torna-se interessante para estudos futuros o cultivo das culturas em escala ampliada para obtenção de novos metabólitos secundários.

3.5 CONCLUSÕES

O presente trabalho investigou a interação química em dois meios de cultura distintos: o meio SWBG-11, onde são cultivadas as linhagens de cianobactérias e o meio PDB, onde são cultivadas as linhagens de fungos no laboratório QOAM-FCFRP-USP.

Por meio da avaliação dos cromatogramas as culturas em meio SWBG-11 não apresentaram resultados relevantes e em meio PDB o extrato bruto de vinte e um dias mostrou-se interessante para dar continuidade ao isolamento dos metabólitos secundários;

Foi verificado através do *screening* do cromatograma de íons totais dos extratos brutos do fungo *P. decaturense* e da co-cultura entre a linhagem *Cyanobium* sp. CENA181 e *P. decaturense*, valores de *m/z* semelhantes e diferentes, visualizados em ambos ou individualmente em cada microrganismo;

Foi isolada do extrato bruto do fungo a substância 10,11-deidrocurvularina e do extrato bruto da co-cultura, a substância curvularina, a qual foi produzida somente neste extrato;

Concluiu-se que houve interação química entre os microrganismos avaliados devido aos valores de *m/z* observados nos espectros e também devido à obtenção da substância curvularina, que foi o pico identificado apenas no cromatograma do extrato bruto da co-cultura, sendo possivelmente sua produção estimulada pela presença da cianobactéria;

Esse trabalho contribui para novos dados obtidos de co-cultura entre fungos e cianobactérias que são ainda escassos na literatura e abre espaço para uma continuidade desse estudo, sendo possível o cultivo em escala ampliada para obtenção de novos metabólitos secundários e também avaliação da atividade biológica dos mesmos.

4. Capítulo III- Uso de redes moleculares (molecular networking) na busca de substâncias bioativas inéditas em linhagens do gênero *Symploca*

4.1 INTRODUÇÃO

4.1.2 Uso de redes moleculares (molecular networking) na investigação de produtos naturais

O uso de redes moleculares vem sendo utilizado nos últimos anos como uma valiosa ferramenta no auxílio da busca por novos produtos naturais, onde podem ser analisados extratos brutos e frações individuais ou em conjunto. Através da análise dos dados obtidos selecionam-se grupos visualizados nesta rede com potenciais compostos inéditos e, além disso, também é possível a desreplicação de substâncias já conhecidas e de seus análogos. Além de produtos naturais, esta ferramenta é utilizada em amostras biológicas, genoma, fármacos e proteínas (WATROUS et al., 2012; ALLARD et al., 2016).

Os dados dos espectros (EM/EM) são inseridos na plataforma GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking), a rede molecular é então gerada através dos fragmentos destes espectros agrupando-os de acordo com a similaridade dos fragmentos, fazendo uma comparação entre o íon molecular e os fragmentos de íons. A rede molecular de EM/EM é criada por um programa chamado MATLAB, fazendo a correlação de textos e atributos, como por exemplo, a atribuição de cores e valores de m/z para os nós, os quais são visualizados no programa Cytoscape (WATROUS et al., 2012; YANG, 2013; ALLARD et al., 2016).

Os grupos de substâncias semelhantes são conectados por traços que formam nós, os quais fazem uma conexão de no máximo dez nós. Eles são agrupados pelo valor angular do co-seno (0-1), o qual mede o parentesco entre as substâncias, onde os traços mais espessos mostram maior similaridade entre as substâncias. Para o co-seno um valor de corte é selecionado na hora da análise, por exemplo, se um valor 0,7 for selecionado, as substâncias geradas terão um valor de similaridade igual ou superior a este, sendo que com valor 1 possuem total similaridade (WATROUS et al., 2012; YANG, 2013; ALLARD et al., 2016).

Em síntese, um nó representa uma substância e o seu parentesco é representado por pontes (traços), assim formando grupos de metabólitos secundários semelhantes e gerando as redes moleculares.

A vantagem da utilização desta ferramenta é que além do íon molecular, os padrões de fragmentação podem ser comparados com bibliotecas de compostos e assim, ser realizada a desreplicação do valor do íon precursor para identificação da substância juntamente com a comparação dos nós vizinhos, sendo possível o reconhecimento de análogos, e também podem ser observadas perdas de massas conhecidas (ALLARD, 2016).

Uma limitação encontrada para identificação de muitas substâncias é o tamanho do banco de dados de fragmentos disponíveis no GNPS, pois menos de 20.000 compostos estão disponíveis nas bibliotecas e estima-se que existam mais de 200.000 produtos naturais já descritos na literatura. A GNPS é uma plataforma global e de acesso aberto, onde pesquisadores do mundo inteiro podem utilizá-la e também contribuir com dados de substâncias isoladas enviando seus espectros (ALLARD, 2016; WANG et al., 2016).

Na Figura 30 abaixo mostra-se um esquema de como é gerada a rede molecular, desde a obtenção dos espectros em EM/EM, a aplicação das fórmulas matemáticas para obter índices de similaridade até a conversão dos textos em atributos até a visualização final da rede molecular.

Figura 30. Esquema representando a rede molecular através de espectros EM/EM, aplicação das fórmulas matemáticas e conversão dos textos em atributos até a geração da rede molecular

Esta ferramenta é muito útil quando se deseja obter substâncias inéditas, pois através do reconhecimento dos grupos onde as mesmas estão presentes, pode-se

fazer um levantamento de dados sobre a massa e aliar técnicas como RMN, para então dar continuidade na exploração da amostra. Este trabalho mostra como esta ferramenta foi utilizada na identificação de substâncias já conhecidas e também na busca por novos produtos naturais.

4.1.3 O gênero *Symploca* e suas substâncias bioativas

O gênero *Symploca* pertence à ordem Oscillatoriales e é composto por colônias filamentosas, as quais formam talos ou emaranhados, se dispondo como tapetes em substratos. Possui células cilíndricas, sem aerótopos, as células se dividem de modo transversal e a reprodução é hormogônia. As espécies são encontradas em solos úmidos, pedras, paredes de musgos, ambiente marinho e fontes termais (KOMÁREK; KOMÁRKOVÁ; KLING, 2003; GUIRY, 2016).

O gênero *Symploca* tem apresentado novas estruturas químicas ao longo dos anos demonstrando distintas atividades biológicas como anticâncer, citotóxica, neurotóxica e inibidora de proteassoma. A espécie *Symploca* sp., coletada nas Bahamas, denominada Symplocin A, exibiu potente atividade inibidora da enzima catepsina E (MOLINSKI; REYNOLDS; MORINAKA, 2012).

As carmaficianas (**34**), que podem ser vistas na Figura 31, foram isoladas quando a Profa. Dra. Hosana M. Deboni realizou em 2010-2011 um estágio de pós-doutoramento no Instituto Scripps de Oceanografia (San Diego - Califórnia, EUA), sob supervisão do Prof. Dr. William H. Gerwick (Bolsista modalidade Novas Fronteiras Proc. FAPESP 09/07429-7). A partir desta oportunidade, foram isolados metabólitos secundários de diferentes espécies de cianobactérias marinhas, dentre estas algumas por meio de técnicas de eliciação química, culminando na obtenção de duas patentes: a primeira, número do registro: WO/2013/010018, data de depósito: 12/07/2012, título: "Compositions and methods for inhibiting proteases" , Instituição de registro:WIPO - World Intellectual Property Organization e a segunda, número do registro: WO2013009923, data de depósito: 17/01/2013, título: "Methods of promoting neuron growth".

Ainda, outros estudos mostraram que o depsipeptídeo cíclico simplostatina 5 (**35**) é um potente inibidor da atividade proteolítica de elastases; além das carmaficianas A e B (Figura 31), que apresentaram atividade inibitória de proteassoma peptídico, apresentando citotoxicidade para células cancerígenas de

cólon e de pulmão (PEREIRA et al., 2012; SALVADOR et al., 2013; GUIRY, M.D.; GUIRY, G.M., 2015).

Além destas, outras substâncias foram isoladas de espécies de *Symploca* e estas demonstraram importante potencial terapêutico, como a dolastatina 10 (**36**) de *Symploca* sp. VP642, um potente agente antitumoral. Hoiamida B é uma substância que pertence à classe dos lipopeptídeos e possui atividade neurotóxica, outra substância análoga denominada hoiamida D (**37**), também isolada de uma linhagem *Symploca* sp. apresentou interação com um supressor tumoral (p53/MDM2), sendo interessante na pesquisa por novos fármacos com atividade anticancerígena, Figura 31 (LUESCH et al., 2001; CHOI et al., 2010; MALLOY et al., 2012).

Substâncias denominadas de veraguamidas A-G são depsipeptídeos que apresentaram atividade citotóxica em dois tipos de linhagens tumorais e pertencem a espécie *Symploca* cf. *hydroides* (SALVADOR et al., 2011).

Figura 31. Substâncias isoladas do gênero *Symploca* com atividade antitumoral

4.1.4 Substâncias cloradas provenientes de cianobactérias marinhas

Compostos halogenados em organismos marinhos dão origem a novas e distintas estruturas químicas devido a disponibilidade de íons como bromo, cloro e iodo na água do mar sendo o cloro o mais abundante disponível (CABRITA; VALE; RAUTER, 2010; CHOI; PEREIRA; GERWICK, 2012; LEÃO et al., 2012), fazendo deles uma importante fonte de novos produtos naturais com atividade biológica e farmacológica (CABRITA; VALE; RAUTER, 2010; CHOI; PEREIRA; GERWICK, 2012).

Compostos clorados distintos com halogênios terminais em cadeias de lipopeptídeos e porções de cloreto de vinila são encontrados em cianobactérias. Substâncias já isoladas e previamente publicadas podem ser citadas como exemplo de substâncias cloradas como taveuniamidas (A-J) (**38**), jamaicamidas (A-C) (**39**), malingamidas (A, S, T) (**40**), lyngbyabellinas (A-I) (**41**), que podem ser vistas na Figura 32, além de, credneramidas (A-B), jantielamida A, kimbeamida A e kimbelactona. As substâncias cloradas provenientes de cianobactérias marinhas tem evidenciado atividades biológicas como citotóxica, bloqueadoras de canais de sódio, anticâncer, etc. (EDWARDS et al., 2004; TAN, 2007; CABRITA; VALE; RAUTER, 2010; MALLOY et al., 2012; NUNNERY et al., 2012).

Figura 32. Substâncias cloradas encontradas em cianobactérias marinhas

O conhecimento sobre a halogenação em produtos naturais marinhos é ainda restrito, podem ser vistas enzimas haloperoxidases vanadato-dependentes (Va-HPO) e não-heme-Fe^{II}/α-cetoglutarato/O₂ halogenase-dependente. Enzimas não-heme Fe^{II} halogenases chamadas SyrB2 e CmaB, precisam de oxigênio, R-cetoglutarato (R-KG) e cloro e elas são responsáveis por executar halogenações, além de enzimas FADH₂-halogenase-dependentes (GALONIĆ; VAILLANCOURT; WALSH, 2006; WAGNER; KÖNIG, 2012).

4.2 OBJETIVOS

4.2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar estudos químicos utilizando a ferramenta de rede molecular (molecular networking) visando o isolamento e elucidação estrutural de substâncias biologicamente ativas presentes em extratos de cianobactérias do gênero *Symploca*

pertencentes à coleção do Instituto Scripps de Oceanografia (SIO) – UCSD, Califórnia-EUA.

4.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Realizar triagem química bioguiada de extratos orgânicos de espécies do gênero *Symploca* pertencentes à coleção do SIO;
- ✓ Utilizar a ferramenta de rede molecular (molecular networking) como auxiliar na busca por grupos de substâncias;
- ✓ Promover o isolamento/purificação e a determinação estrutural de substâncias de interesse através de técnicas cromatográficas, espectroscópicas e espectrométricas;
- ✓ Submeter os metabólitos isolados a ensaios biológicos

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Coleção de culturas de cianobactérias marinhas

Diversas espécies de cianobactérias vêm sendo coletadas durante anos pelo grupo do Prof. Dr. Gerwick. Estas coletas são realizadas em diferentes localidades, como por exemplo, Curaçao, Panamá, Papua Nova Guiné, Indonésia, Havaí dentre outros, e estas espécies tem sido identificadas (taxonomia e biologia molecular) como pertencentes à diversos gêneros tais *Lyngbya*, *Phormidium*, *Oscillatoria*, *Symploca* dentre outras. Geralmente, as culturas de cianobactérias são mantidas estáveis em culturas isoladas no laboratório (Laboratório Gerwick, Instituto Scripps de Oceanografia, Universidade da Califórnia) ou preservadas em soluções contendo etanol para eventuais estudos químicos e biológicos.

Solventes

- ✓ Solventes de grau cromatográfico para extração, fracionamento e isolamento;
- ✓ Solventes deuterados: metanol-D4 (D 99,8%) e benzeno 99,6%, ambos com TMS, da marca Sigma-Aldrich®

Equipamentos

- ✓ Espectrômetro de infravermelho Jasco P 200;
- ✓ Espectrômetro de ultravioleta UV Beckman DU800;
- ✓ CLAE-DAD Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific®);
- ✓ RMN Varian vx500; Varian Inova 500 MHz e Bruker 600 MHz (CDCl₃ (δH 7,26; δC 77,0) foram usados como padrão interno;
- ✓ Espectrômetro de massas de alta resolução da marca Agilent®, quadrupolo simples com um sistema CLAE com bombas quaternárias, coluna Eclipse XDB-C18 (4.6 × 150 mm, 5 μm);
- ✓ Cromatógrafo Thermo Finnigan Surveyor Auto-amostrador-Plus/LC-Pump-Plus/PDA-Plus com sistema acoplado a espectrômetro de massas de baixa resolução Thermo Finnigan LCQ Advantage Max ajustado e coluna Phenomenex Kinetex C-18 100 Å 100 × 4.60 mm.

4.3.2 Extração e fracionamento dos extratos

Foram selecionadas nove linhagens do gênero *Symploca* provenientes de Samoa Americana, Panamá e uma espécie da coleção de cultura de cianobactérias de Pasteur (PCC8002) para triagem química dos extratos brutos e frações (Tabela 11).

As amostras provenientes do Panamá foram extraídas e fracionadas pela Profa. Dra. Amanda Fenner (University of Hawaii, Manoa) durante seu período de pós-doutoramento no Scripps Institution of Oceanography (UCSD, Califórnia, USA), com período de pesquisa realizado no Panamá, devido a uma cooperação científica entre os dois países.

As amostras *Symploca* A2234 (Figura 33) e PPC8002 foram extraídas durante o doutorado-sanduíche, conforme metodologia abaixo.

Figura 33. Linhagem de cianobactéria *Symploca* sp. A2234 coletada em Samoa Americana. A: amostra ambiental coletada durante um mergulho; B: Análise microscópica (Créditos das fotos: Laboratório do Prof. Dr. William Gerwick)

Tabela 11. Linhagens do gênero *Symploca* provenientes de Samoa Americana, Panamá e da coleção de cultura de Pasteur (PCC8002)

	Código interno das amostras	Código da coleção	Espécie	Local de origem
1	A2133	PAP-24JAN13-3	<i>Symploca</i> sp.	Panamá
2	A2136	PAP-28JAN13-1	<i>Symploca</i> sp.	Panamá
3	A2141	PAP-25APR13-3	<i>Symploca</i> sp.	Panamá
4	A2143	PAB-6APR13-2	<i>Symploca</i> sp.	Panamá
5	A2148	PAB-05APR13-1	<i>Symploca</i> sp.	Panamá
6	A2149	PAB-05APR13-2	<i>Symploca</i> sp.	Panamá
7	A2234	ASF-14JUL14-1	<i>Symploca</i> sp.	Samoa Americana
8	A2228	ASI-16JUL14-3	<i>Symploca</i> sp.	Samoa Americana
9	PCC8002	PCC8002	<i>Symploca atlantica</i> PCC8002	Coleção de cultura de Pasteur (PCC8002)

O método de extração e o fracionamento (Figura 34) utilizados são os mesmos do item 2.5.1, que já é utilizado no Laboratório de Química Orgânica do Ambiente Marinho-NPPNS-FCFRP-USP, conforme metodologia utilizada no laboratório do Prof. William H. Gerwick (Scripps Institution of Oceanography – Universidade da Califórnia – San Diego-EUA).

Figura 34. Fluxograma de fracionamento de extratos brutos utilizando gradiente de solventes

Extratos e frações foram concentrados sob pressão reduzida à temperatura máxima de 35 °C.

4.4 Triagem química e biológica dos extratos brutos e frações

4.4.1 Triagem química

Os extratos brutos e frações, na concentração de 1,0 mg/mL, foram injetados em CLAE-EM/EM de baixa resolução, a varredura foi feita em modo positivo (m/z 190-2000). Fase móvel: ACN:H₂O; Gradiente: 0-5 min (30% de ACN); 5-22 min (30-99% de ACN) e 22-25 min (99% de ACN), retornando ao gradiente inicial em 30% de ACN de 26 a 30 min. Fluxo: 0,7 mL/min. Foram utilizados os extratos brutos e frações (A-I) para realização da rede molecular.

4.4.2 Obtenção da rede molecular

Os cromatogramas obtidos das análises de EM/EM foram convertidos para arquivos de mzxml, por meio do programa MSConvert (www.proteowizard.sourceforge.net). Os arquivos de EM/EM convertidos foram submetidos para a plataforma GNPS molecular networking (<http://gnps.ucsd.edu>). A rede molecular foi gerada pela interconexão de espectros EM/EM das amostras comparadas, utilizando-se também um branco do solvente da análise e processada

pelo programa Cytoscape 3.2.1 para seleção dos grupos de substâncias e *m/z* a serem trabalhados.

4.4.3 Avaliação das atividades biológicas dos extratos brutos e frações

4.4.3.1 Avaliação das atividades antiparasitárias e de citotoxicidade

Os bioensaios visando atividade contra *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium* e citotoxicidade contra linhagens celulares de câncer de mama MCF-7 foram realizados no Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología, Center of Cellular and Molecular Biology of Diseases, Panamá sob a Supervisão da Profa. Dra. Carmenza Spadafora, avaliando os extratos brutos e frações de: A2136, A2141, A2143, A2148 e A2149

Leishmania (*Leishmania donovani*): O agente etiológico da leishmaniose visceral, *Leishmania donovani* (LD-1S/MHOM/SD/00-estirpe 1S), foi testado na fase amastigota axênico. O crescimento do parasita e sua sobrevivência foram medidos utilizando-se PicoGreen Fluorocromo, um fluoróculo ultra sensível para medição de DNA de fita dupla. As amostras foram testadas em duplicata em uma concentração de 10 µg/mL. Os resultados foram expressos em porcentagem através da inibição do crescimento do parasita e foram comparados com o controle. As amostras que tiveram um índice de inibição crescimento (IC) ≥65% foram consideradas ativas. A anfotericina B foi usada como controle positivo, e a resposta típica do IC₅₀ para *L. donovani* para este antibiótico é em torno de 70-120 ng/µL (Martínez-Luis et al., 2011).

Trypanosoma cruzi: O agente etiológico da doença de Chagas é o protozoário *T. cruzi*. Neste estudo foi utilizada a cepa Tulahuen, clone C4 de *T. cruzi* expressando a enzima β-galactosidase transgênica. Células de rim de macaco verde africano (Vero) foram plaqueadas e após 24 h foram adicionadas formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Após 48 h de infecção foram adicionados extratos brutos, frações e controle na concentração de 10 µg/mL. Os ensaios foram realizados em triplicata. A inibição do crescimento do parasita (IC%) foi medida colorimetricamente cinco dias depois, baseado na clivagem de vermelho de clorofenol- β-D-galactopiranosídeo pela

expressão do gene para β -(β -Gal) expressa pelo parasita no clone recombinante Tulahuen C4 de *T. cruzi*. A leitura da placa foi realizada a 570 nm utilizando um leitor de microplacas Bio-Rad benchmark. As amostras com valores de IC $\geq$ 65% foram consideradas ativas. O controle positivo usado foi nifurtimox (Martínez-Luis et al., 2011; Pavlik et al., 2013).

***Plasmodium Falciparum*:** O agente etiológico da malária é o *P. falciparum*. A atividade antiplasmodial dos extratos brutos e frações foi avaliada usando método fluorimétrico no qual o DNA do parasita é detectado pelo fluoróculo PicoGreen em uma linhagem do parasita resistente à cloroquina, droga de primeira escolha no tratamento da malária (Indocrina W2). O parasita foi mantido *in vitro* pela modificação do método de Trager e Jensen (1997). A cloroquina foi utilizada como controle positivo do ensaio (IC₅₀= 80-100 nm). Os resultados foram expressos como % de IC comparados com o controle. As amostras com valores de IC $\geq$ 65% foram consideradas ativas (Martínez-Luis et al., 2011).

Ensaio citotóxico MCF-7: A atividade citotóxica dos extratos brutos e frações foram testadas em linhagens de câncer de mama MCF-7, o qual foi determinado seguindo o protocolo padrão do Instituto Nacional do Câncer (EUA) (MONKS et al., 1991). Células Vero foram aderidas em microplacas de 96 poços e foram usadas para avaliar a toxicidade das amostras (10 μ g/mL) baseando-se na redução de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT, Sigma®). As células foram tratadas com as amostras por 4 h a 37 °C, a viabilidade celular foi avaliada por um leitor de ELISA a 570 nm. O controle utilizado foi anfotericina B e a atividade foi expressa pela inibição do crescimento em relação ao controle. As amostras com valores de IC $\geq$ 65% foram consideradas ativas (Martínez-Luis et al., 2011).

Avaliação da toxicidade frente à *Artemia salina*

Foram selecionadas algumas frações, as quais foram testadas: A2136 H, A2143 E, F e G, A2149 H, A2234 G, H e I. Após 24 h de eclosão dos ovos da *Artemia salina* em água do mar artificial, foram utilizadas alíquotas de 2 mL em poços de 3 mL, em duas diferentes concentrações de amostra (3 μ g/mL e 30 μ g/mL), a seguir foi completado o volume (0,5 mL) de água do mar artificial, obtendo um volume final de 2,5 mL. As amostras foram solubilizadas em metanol, o qual foi

utilizado como controle negativo. Após 24h foi realizada a contagem dos náuplios vivos e mortos (MEYER et al., 1982; HAN et al., 2003). Este bioensaio foi realizado no laboratório do Prof. Dr. William Gerwick.

4.5 Isolamento e identificação de substâncias da linhagem *Symploca* A2143

4.5.1 Obtenção das substâncias LA2143G1.2.2 e de LA2143EF3

A linhagem *Symploca* sp. A2143 foi selecionada de acordo com suas frações bioativas em combinação com dados de espectrometria de massas, rede molecular (Figura 36), RMN e quantidade de amostra, os quais foram fatores que em conjunto contribuíram para dar continuidade ao isolamento das frações.

A linhagem *Symploca* sp. A2143 foi coletada em Abril de 2013 no Parque Nacional Marinho Ilha Bastimentos (9°22'24.0"N 82°18'06.0"W), Bocas del Toro, Panamá. Apresenta-se como um pincel, com pequenos e rígidos tufo vermelhos-arroxeados. A coleta foi feita a mão através de mergulho em profundidade de 10-20 pés, na borda de corais (vivos e mortos) e na areia.

Abaixo está o fluxograma (Figura 35) de extração e isolamento do extrato bruto e frações da linhagem *Symploca* sp. A2143, até obtenção das substâncias isoladas desta amostra.

Figura 35. Fluxograma da extração e obtenção das substâncias isoladas da linhagem *Symploca* sp. 2143

A fração G foi injetada em CLAE-DAD e foi usada coluna C18 Phenomenex® Kinetex (150 x 10.00 mm, 5 µm), sistema gradiente de solvente (65% ACN/H₂O-5 min, gradiente linear até 80% ACN-15 min, gradiente linear até 100% ACN em 5 min), fluxo de 4,0 mL/min para obter a substância LA2143G1.2.2, identificada como 4,6,8,10,12,14,16,18,20,22-decametóxi-heptacos-1-eno (1,77mg, t_R = 17,6 min, 0,06% v/v de extrato bruto obtido).

As frações E e F foram separadamente injetadas, foi utilizada coluna Phenomenex® Synergi Fusion C18 (250 x 10.00 mm x 4 µm) e sistema gradiente de solvente igual o anterior, fluxo de 4,0 mL/min. As subsfrações foram reinjetadas em CLAE-EM/EM e após análise foram combinadas, onde foi obtida a substância LA2143F3 (0,90 mg, t_R 7,6 min, 0.02% v/v de extrato bruto obtido) Esta substância é inédita e foi chamada de Caracolamida A.

4.6 Avaliação das atividades biológicas das substâncias isoladas 4,6,8,10,12,14,16,18,20,22-decametóxi-heptacos-1-eno e de caracolamida A

4.6.1 Avaliação da atividade antiparasitária

As substâncias 4,6,8,10,12,14,16,18,20,22-decametóxi-heptacos-1-eno e caracolamida A foram testadas em ensaios biológicos para avaliar a atividade contra *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei* foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Jair Lage de Siqueira-Neto (Skaggs School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences-UCSD, Califórnia, EUA).

***Trypanossoma cruzi*:** A linhagem celular de mioblastos C2C12 (ratos) foram semeadas em microplacas de 1536 poços e infectadas com formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Em seguida, foram adicionadas as substâncias. Após 72 h de incubação a 37 °C, 5% de CO₂, os conteúdos das microplacas foram fixados com paraformaldeído 4% por 30 min. Os poços foram em seguida aspirados e o ácido nucléico corado com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). As placas foram lidas em microscópio automatizado ImageXpress MicroXL e as imagens analisadas por software personalizado para avaliação da citotoxicidade (baseado na contagem de células) e a eficácia anti-parasitária (baseada na redução dos parasitas). Benzonidazol foi utilizado como controle. Dados relativos à eficácia foram

normalizados com base em poços não tratados (controles negativos) e poços não infectados (controles positivos) (MOON et al., 2014).

***Leishmania donovani*:** A linhagem celular de monócitos B10R foi usada como hospedeira para infecção de *L. donovani* em microplacas de 1536 poços. As células foram semeadas 24 h antes da infecção com formas promastigotas de Leishmania. A seguir, foram adicionadas as substâncias e incubou-se durante 72 h a 37 °C, 5% de CO₂. Os poços foram fixados com 4% de paraformaldeído durante 30 min seguido por coloração do DNA com DAPI. As placas foram lidas em microscópio automatizado ImageXpress MicroXL e as imagens analisadas por software personalizado para avaliação da citotoxicidade (com base na contagem de células) e a eficácia anti-parasitária (com base na redução de parasitas). A anfotericina B foi usada como controle. Dados relativos à eficácia foram normalizados com base em poços não tratados (controles negativos) e poços não infectados (controles positivos) (SIQUEIRA-NETO et al., 2012).

***Trypanossoma brucei*:** As substâncias foram adicionadas em microplacas de 1536 poços. Os parasitas na fase log inicial de crescimento foram dispensados e incubados durante 72 h, 37 °C, 5% de CO₂, ponto no qual os tripanossomas foram lisados pela adição de SYBR Green I em solução de lise [30 mM Tris pH 7,5, 7,5 mM EDTA, 0.012% saponina, e 0,12% Triton X-100]. As placas foram encubadas no escuro durante 1 h à temperatura ambiente, a seguir foi realizada a leitura em um leitor de placas Envision. A pentamidina foi utilizada como controle positivo para os ensaios e os poços não tratados como controles negativos (FARIA et al., 2014).

4.6.2 Ensaio citotóxico em linhagens H460

Os testes foram realizados pela Dra. Evgenia Glukov, sob a supervisão do Prof. Dr. William Gerwick. Foram testadas as substâncias isoladas 4,6,8,10,12,14,16,18,20,22-decametóxi-heptacos-1-eno e de caracolamida A em linhagens celulares de câncer de pulmão H460 com viabilidade celular, sendo determinada pela redução brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT, Sigma®). As células foram cultivadas em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 contendo L-glutamina (Mediatech, Manassas, VA) e

suplementado com piruvato de sódio (1 mM), estreptomicina (100 µg/mL), penicilina (100 U), bicarbonato de sódio (0,15%) e soro fetal bovino (SFB) (10%) a 37 °C, 5% de CO₂. As células foram semeadas em microplacas de 96 poços a 6660 células/poço em 180 µL. Após 24 h, as substâncias foram dissolvidas em DMSO a concentração de 1mg/mL seguido de diluições de dez vezes com 180 µL de meio RPMI-1640 (sem soro bovino fetal) e nove diluições de três vezes em série com RPMI-1640. Em seguida, 20 µL/poço de todas as misturas foram adicionado às células em duplicata. Assim, a concentração máxima de DMSO foi de 0,1%. Um volume igual de meio RPMI-1640 foi adicionado aos poços designados como controles negativos para cada placa. Após 48 h, o meio foi removido por aspiração e a viabilidade celular determinada por coloração com MTT. Todos os ensaios foram validados utilizando doxirrubicina em 1,0 e 0,1 µL/mL como controle positivo. Os valores de absorbância foram medidos no leitor de placas Ascent ThermoElectron Multiskan a 570 e 630 nm. Os gráficos de dose-resposta foram gerados utilizando o GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) para a determinação de valores de IC₅₀ (BERTIN et al., 2016).

4.6.3 Monitoramento intracelular dos canais de Ca²⁺ em neurônios

Os experimentos de atividade neuromoduladora foram realizados no Departamento de Farmacologia, Creighton University School of Medicine (Omaha, Nebraska) sob supervisão do Prof. Dr. Thomas F. Murray. A substância inédita caracolamida A foi testada nesse ensaio biológico e esta, foi comparada com o padrão feniletilamina.

Cultura neurocortical: Os cuidados com os animais e sua manipulação são cumpridos de acordo com os protocolos aprovados pela Creighton University Institutional Animal Care and Use Committee, utilizando-se de medidas para minimizar a dor e o desconforto empregado. Fêmeas Swiss-Webster grávidas foram sacrificadas por asfixia com CO₂ e no 16º dia do desenvolvimento embrionário os ratinhos foram removidos sob condições estéreis. Córtex cerebrais foram dissecados, despojado das meninges, picados, e incubados com tripsina durante 25 min a 37 °C. As células foram dissociadas por trituração em um tampão de isolamento contendo inibidor de tripsina de soja e DNase, foram então centrifugadas, e ressuspensas em meio mínimo essencial (MME) Eagle com sais

de Earle e suplementado com 1 mM de *L*-glutamina, soro bovino fetal a 10%, soro de cavalo a 10%, 100 UI/mL de penicilina, e 0,10 mg/mL de estreptomicina (pH 7,4). As células foram plaqueadas em poli-*L*-lisina-revestidas, com 96 poços (9 mm), placas de cultura de cor preta com fundo claro (MidSci, St. Louis, EUA) a uma densidade de $1,5 \times 10^5$ células/poço. As células foram então incubadas a 37 °C a 5% de CO₂ e 95% de umidade. Citosina-arabinosídeo (ARA-C; 10 µM) foi adicionada ao meio de cultura 24 h após o plaqueamento para prevenir a proliferação de células não neuronais. A partir do 4º dia *in vitro*, o meio de cultura foi mudado a cada dois dias utilizando um meio de crescimento isento de soro contendo meio Neurobasal suplementado com B-27, 100 UI/mL de penicilina; 0,10 mg/mL de estreptomicina, e 0,2 mM de *L*-glutamina. Os experimentos foram realizados em culturas cérebro-corticais *in vitro* a 12 dias (CAO et al. 2010; CAO et al. 2008).

Monitoramento de Ca²⁺ intracelular: Culturas de neurônios cérebro-corticais foram usadas para medições da [Ca²⁺]_i a 12 dias *in vitro* (DIV12) como descrito anteriormente (CAO et al., 2010). O meio de crescimento foi removido e substituído por meio de corante de carga (100 µL por poço) contendo 4 µM Fluo-3 AM e 0,04% de ácido plurônico em tampão de Locke (HEPES 8,6 mM, KCl 5,6 mM, NaCl 154 mM, glicose 5,6 mM, MgCl₂ 1,0 mM, CaCl₂ 2,3 mM, glicina 0,0001 mM, pH 7,4). Após 1 h de incubação em meio de corante de carga, os neurônios foram lavados quatro vezes com tampão de Locke (180 µL por poço) recém-preparado utilizando um lavador de microplacas automático (Bio-Tek Instruments Inc., VT, EUA) e transferidos para um FLIPR II (Molecular Devices, Sunnyvale, EUA). As células foram excitadas a 488 nm e emissões de indicador fluorescente de Ca²⁺ (Fluo-3) foram gravadas a 515-575 nm em intervalos de 0,5 s. Foi utilizada tetrodoxina como controle negativo e veratridina como controle positivo (DRAVID; MURRAY, 2004). Após a gravação da linha de base de fluorescência durante 2 minutos, 20 µL de 10 vezes de concentrações de compostos foram adicionados aos poços a uma taxa de 20 µL/s, a fluorescência foi monitorada durante um período adicional de 2 minutos.

4.7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.7.1 Uso de rede molecular (molecular networking) como ferramenta auxiliar na identificação de substâncias

O uso de redes moleculares permite identificar similaridades químicas entre substâncias e é uma poderosa ferramenta para complementar as técnicas de identificação. Com o auxílio dessa ferramenta foi possível identificar frações com substâncias conhecidas e também selecionar alvos de substâncias desconhecidas para prosseguir com o isolamento.

Foram comparados os componentes químicos dos extratos brutos e frações de nove espécies do gênero *Symploca* provenientes do Panamá (A2133, A2136, A2141, A2143, A2148, A2149), Samoa Americana (A2234) e uma espécie da coleção de cultura de cianobactérias de Pasteur (PCC8002), vistos na Tabela 11.

Os espectros de EM/EM dos extratos brutos e frações foram inseridos no GNPS (Global Natural Product Social Molecular Networking) e analisados no programa Cytoscape para obtenção da rede molecular (molecular networking), Figura 36. Foram analisados os extratos brutos e todas as frações em conjunto, onde foram verificados os grupos de metabólitos desconhecidos e também foram selecionados os grupos de metabólitos conhecidos para confirmação dos mesmos, cada linhagem foi representada por uma coloração diferente na rede molecular

Os dados obtidos foram comparados com os espectros dos bancos de dados presentes no GNPS, após esta análise foram selecionadas todas as substâncias que foram consideradas semelhantes e a seguir comparadas com espectros CL-EM/EM e com o tempo de retenção de padrões de substâncias já isoladas no laboratório (Gerwick's library).

Figura 36. Rede molecular (molecular networking) do extrato bruto e frações (A- I) de linhagens do gênero *Symploca* (A2133, A2136, A2141, A2143, A2148, A2149, A2228, A2234, PCC8002) provenientes do Panamá, Samoa Americana e da coleção de cultura de cianobactérias de Pasteur

As substâncias que tiveram correspondência com os padrões já isolados e identificados no laboratório foram Apratoxina A (m/z 840,35) (**42**), encontrada no extrato bruto 2141 e na fração 2141_H (Anexo A-Figura 72); Palmiramida A (m/z 672,14) (**43**) foi correspondente com a fração 2228_E (Anexo A-Figura 73), neste grupo pode ser observado um valor de m/z 694,719 que é sua forma sodiada; Curacina D (m/z 360,07) (**44**) teve correspondência no extrato bruto 2136 e nas frações 2136_C, 2136_D, no extrato bruto 2141 e na fração 2141_C (Anexo A-Figura 74); no extrato bruto 2143 e nas frações 2143_C e F, o valor de m/z para curacina D aparece conectado a um possível análogo em m/z 388, 291 (Anexo A-Figura 74) (MARQUEZ et al., 1998; LUESCH et al. 2001; CHOI, et al., 2010; TANIGUCHI et al., 2010).

As substâncias foram originalmente isoladas de espécies de *Lyngbia majuscula*, a substância Apratoxina A foi ativa em linhagens de câncer de cólon, a substância Palmiramida A apresentou atividade citotóxica em linhagens de célula tumoral H460 de pulmão e a substância curacina D, possui toxicidade frente à *Artemia salina* (MARQUEZ et al., 1998; LUESCH et al. 2001; CHOI, et al., 2010; TANIGUCHI et al., 2010).

Muitas frações tiveram correspondência com diferentes substâncias no GNPS, uma análise mais detalhada permitiu identificar as que realmente tiveram todos os dados compatíveis, isto é muito importante, pois o banco de dados reconhece alguns fragmentos semelhantes dando um falso positivo. O que torna essa ferramenta interessante é o fato de poder ajudar na seleção de frações com substâncias potencialmente inéditas.

Os espectros de massas são apresentados no Anexo A-Figuras 72-74; onde foram comparados com os espectros dos padrões das substâncias já isoladas no laboratório através de (EM e EM/EM), foram considerados os tempos de retenção próximos e as fragmentações mais semelhantes possíveis.

É importante salientar que todas as frações selecionadas após obtenção dos dados de CL-EM/EM, rede molecular (molecular networking) e RMN tiveram seus valores de m/z desreplicados também em bases de dados como Marinlit, Dicionário de Produtos Naturais e Dicionário de Produtos Naturais Marinhos.

A substância Samoamida A isolada da espécie A2228 e da fração H aparece em destaque na rede molecular (Figura 36), pois através da intensidade foi a mais notável na análise dos dados dentre as nove espécies. Ela pertencia a um grupo de substâncias desconhecidas. Samoamida A (**45**) foi isolada e identificada pelo aluno de pós-doutorado Dr. Benjamin Naman e é uma substância inédita, a qual demonstrou potente atividade citotóxica em linhagens de câncer de pulmão H460 (NAMAN et al., 2017).

O uso da rede molecular permite uma desreplicação relativamente rápida de substâncias presentes em misturas complexas ou puras, as quais se confirmam com outras análises (YANG et al., 2013).

4.8 Avaliação das atividades biológicas

4.8.1 Avaliação das atividades antiparasitárias e de citotoxicidade

Foi realizado um *screening* com o extrato bruto e frações do gênero *Symploc*a para posterior seleção das frações ativas e com quantidade suficiente para dar prosseguimento ao isolamento das substâncias ativas. A tabela 12 abaixo mostra a seleção de frações ativas:

Todas as frações que foram ativas, foram posteriormente analisadas em RMN e selecionadas para isolamento juntamente com os dados de CL-EM/EM. Após obtenção dos dados da rede molecular foram analisadas e selecionadas algumas frações para dar prosseguimento ao isolamento dos grupos de compostos desconhecidos de acordo com o banco de dados da rede molecular e do levantamento de dados realizado. As frações selecionadas foram A2141 F; A2143 (E, F, G, H e I); A2149 (E, F e H) e A2234 (G, H e I), através dos dados de RMN foram selecionadas as frações A2143 E, F e G, para dar início ao isolamento das substâncias. A tabela 12 abaixo mostra os resultados das atividades biológicas de acordo com os ensaios descritos no item 4.2.2:

Tabela 12. Linhagens do gênero *Symploca* da coleção do laboratório do Prof. Dr. William Gerwick provenientes do Panamá e Samoa Americana

<i>Symploca</i> (Panamá)							
Código	Extrato bruto (E. B.) e frações (A-I)	Inibição do IC (%)			IC (%)	% de náuplios mortos	
		<i>Leishmania</i>	<i>T. cruzi</i>	<i>P. falciparum</i>		Toxicidade frente à <i>Artemia salina</i>	
					Linhagem cancerígena MCF-7:	3 µL	30 µL
A2133	E. B. (110,8 mg)	-	-	-	19,6	-	-
	A (52,3 mg)	-	-	-	16,4	-	-
	B (41,0 mg)	-	-	-	19,1	-	-
	F (13,2 mg)	-	-	-	20,8	-	-
	H (1,0 g)	-	-	-	22,0	-	-
	I (14,1 mg)	-	-	-	17,1	-	-
A2136	E. B. (35,6 mg)	-	-	-	20,0	-	-
	A (8,3 mg)	-	-	-	17,9	-	-
	C (29,6 mg)	-	-	-	23,4	-	-
	G (8,9 mg)	-	-	-	17,8	-	-
	H (170 mg)	-	-	-	33,7	-	-
	I (180 mg)	-	-	-	22,9	-	-
A2141	F (10,5 mg)	-	-	91,4	12,8	-	-
	G (4,6 mg)	70,5	76,9	88	8,9	-	-
	H (19,4 mg)	-	71,6	-	13,8	-	-
	I (4,0 mg)	-	-	-	24,7	-	-
A2143	E. B. (64,5 mg)	-	81,5	86,1	11,3	-	-
	E (40,0 mg)	-	80,3	-	15,0	-	-
	F (20,0 mg)	-	83,0	-	16,5	-	-
	G (29,0 mg)	-	71,3	-	18,1	51	84
	H (235,8 mg)	68,5	87,0	87,3	10,5	25	91
	I (722,0 mg)	-	-	86,2	12,0	-	-
AA2148	E. B. (4,2 mg)	-	-	-	22,1	-	-
	G (0,9 mg)	-	-	87,2	21,8	-	-
	H (22,5 mg)	-	-	-	17,2	-	-
	I (174,8 mg)	-	-	-	18,6	-	-
A2149	E. B. (21,3 mg)				21,2	-	-
	A (21,2 mg)				-	-	-
	B (57,4 mg)				13,9	-	-
	F (5,6 mg)	-	-	87,6	18,4	-	-
	G (2,6 mg)	69,6	-	91,5	9,9	-	-
	H (49,7 mg)	71,2	-	85,0	13,1	-	-
	I (285,0 mg)	-	-	-	13,9	-	-
<i>Symploca</i> (Samoa Americana)							
A2234	G (20,0 mg)	-	-	-	-	22	58
A2234	H (88,4 mg)	-	-	-	-	0	75
A2234	I (100,0 mg)	-	-	-	-	2	34

4.9 Isolamento e identificação de substâncias

4.9.1 Determinação da substância 4,6,8,10,12,14,16,18,20,22-decametóxi-heptacos-1-eno

A substância isolada com o código LA2143G1.2.2 é quimicamente conhecida como 4,6,8,10,12,14,16,18,20,22-decametóxi-heptacos-1-eno (Figura 37, **46**), a qual pertence à classe dos polimetóxi-1-alquenos (PMA) isotáticos, sendo encontrados poucos relatos na literatura. Além desta, outras substâncias da mesma classe já foram identificadas, variando no número de metoxilas (7 a 10) e, conseqüentemente no tamanho da cadeia (MYNDERSE; MOORE, 1979; BANKER et al., 2000; JAJA-CHIMEDZA et al., 2012; JAJA-CHIMEDZA et al., 2015).

Apresentando sinais característicos de dupla ligação como um duplo-duplo tripleto em δ 5,91 ligado a carbono δ 135,5 e dois deslocamentos em δ 5,10 e δ 5,08 ligados a carbonos δ 117,3. Uma série de deslocamentos com valor entre δ 3,17-3,29, todos simpletos, ligados a carbonos com valor de δ 56,2-56,4 correspondem a dez grupos metoxílicos. Dois grupos metilênicos equivalentes foram observados na cadeia terminal δ 1,31(m,4H) ligados a C-25 (δ 23,3) e C-26 (δ 23,3), os quais estão vizinhos a três hidrogênios metílicos (δ 0,92) atribuídos ao C-27 (δ 14,6). Dois deslocamentos químicos sobrepostos em δ 3,38 (m, 2H) estão ligados a C-4 (δ 77,8) e C-22 (δ 78,3). Um sinal em δ 3,65 (m, 8H) é correspondente a hidrogênios com mesmo deslocamento químico e estão ligados a carbonos com deslocamento químico de δ 75,8-78,3, como pode ser observado na Tabela 12. Sobreposições de multipletos foram observadas em δ 2,03 (m, 9H), δ 1,82 (m, 7H), 1,68 (m, 2H), 1,56 (m, 2H), 1,46 (m, 2H), 1,31 (m, 4H), os dados de RMN podem ser vistos nas Figuras 76-78 do Anexo A.

Figura 37. Estrutura da substância 4,6,8,10,12,14,16,18,20,22-decametóxi-heptacos-1-eno

Abaixo encontram-se os dados experimentais obtidos da análise de RMN de ^1H e ^{13}C da substância LA2143G1.2.2, os quais também podem ser observados na Tabela 13.

4,6,8,10,12,14,16,18,20,22-decametóxi-heptacos-1-eno: ^1H RMN (500 MHz, benzeno- d_6) δ 0,92 (t, $J = 7,0$ Hz, 3H); δ 1,31 (m, 4H); δ 1,46 (m, 2H); δ 1,56 (m, 2H); δ 1,68 (m, 2H); δ 1,82 (m, 7H); δ 2,30 (m, 2H); δ 2,03 (m, 9H); δ 3,17 (s, 3H); δ 3,22 (s, 3H); δ 3,23 (s, 3H); δ 3,25 (s, 3H); δ 3,26 (s, 3H); δ 3,28 (s, 3H); δ 3,28 (s, 3H); δ 3,29 (s, 9H); δ 3,38 (m, 2H); δ 3,65 (m, 8H); δ 5,08 (m, 1H); δ 5,10 (d, 1H, $J = 17, 2$ Hz); δ 5,91 (ddt, $J = 17,2; 7,1$ e $10,21$ Hz, 1H).

^{13}C RMN (125 MHz, benzeno- d_6) δ 14,6; δ 23,6; δ 25,3; δ 32,7 - δ 38,9; δ 56,2-56,4; δ 75,8 -78,3; δ 117,3; δ 35,5.

Tabela 13. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 4,6,8,10,12,14,16,18,20,22-decametóxi-heptacos-1-eno, em C_6D_6 , comparados com dados da literatura

C	δ_{H} (mult; H, J (Hz)) ^a	δ_{H} (mult; H, J (Hz)) ^b	δ_{C}
1	5,10 (d, 1H, $J = 17, 2$)	5,10 (dd, $J = 17,2, 1$ H)	117,3
	5,08 (m, 1H, $J = 10, 2$)	5,07 (dd, $J = 10, 2, 1$ H)	117,3
2	5,91 (ddt, $J = 17,2; 7,1, 1$ H)	5,90 (ddt, $J = 17, 10, 7, 1$ H)	135,5
3	2,30 (m, 2H)	2,30 (m, 2H)	38,7
4	3,38 (m, 1H)	3,37 (m, 1H)	77,8
6, 8...20	3,65 (m, 8H),	3,64 (m, 8H),	75,8-76,0
5, 7, 9...19	1,82- 2,03 (m, 16H)	1,81- 2,03 (m, 16H)	34,2-38,9
21	1,68 (m, 2H)	1,68 (m, 2H)	34,2
22	3,38 (m, 1H)	3,37 (m, 1H)	78,3
23	1,56 (m, 2H)	1,58 (m, 2H)	25,3
24	1,46 (m, 2H)	1,44 (m, 2H)	32,7
25	1,31 (m, 2H)	1,30 (m, 2H)	23,3
26	1,31 (m, 2H)	1,30 (m, 2H)	23,3
27	0,92 (t, $J = 7,0, 3$ H)	0,91 (t, 3H, $J = 7,1$)	14,6
28-37	3,17-3,29 (s,30H, MeO)	3,16-3,28 (s,30H, MeO)	56,2-56,4

^a Dados experimentais

^b Dados da literatura (JAJA-CHIMEDZA et al., 2012; JAJA-CHIMEDZA et al., 2015)

A massa obtida para a substância LA2143G1.2.2 foi observada no valor de m/z 679,53890 $[M+H]^+$. Além do aducto de sódio observado em m/z 701,153566 $[M+Na]^+$ foi observada uma perda de 32 uma ($-OCH_3$ perdido como CH_3OH) em m/z 647,50999 (Anexo A-Figura 79).

O metabólito isolado apresentou fórmula molecular ($C_{37}H_{74}O_{10}$), calculado para m/z 679,53548; com erro de 5,18 ppm). O UV da substância é de 200 nm e possui $[\alpha]^{24}_D +73,30$ (c 0.05, CH_3OH), a estrutura pode ser vista na Figura 37.

Esta substância foi encontrada pela primeira vez no gênero *Symploca* e foi anteriormente relatada em outras espécies de cianobactérias, como *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Aphanizomenon ovalisporum* e *Scytonema ocellatum* em estudos que relatam esta classe como metabólitos secundários que apresentam toxicidade, contribuindo com as cianotoxinas já conhecidas como tóxicas. Estudos mais recentes dessa classe mostraram efeitos teratogênicos em Zebra Fish, e mais estudos ainda são necessários para avaliar as suas propriedades tóxicas. Estes estudos poderão contribuir no reconhecimento de toxinas e também das linhagens que as produzem (MORI et al., 1991; JAJA-CHIMEDZA et al., 2012; JAJA-CHIMEDZA et al., 2015).

4.9.2 Isolamento da substância inédita caracolamida A

A substância isolada com o código LA2143EF3 é inédita e foi denominada de caracolamida A (**47**), Figura 41.

Os dados obtidos para o espectro na região do Infravermelho da substância caracolamida A (Figura 38) apresentaram uma banda de carbonila de amida em $1.643,0\text{ cm}^{-1}$, uma banda em $3.301,5\text{ cm}^{-1}$ correspondente ao NH; um estiramento em $702,0$ que pode estar relacionado com a ligação C-Cl; estiramentos em $2.8757,0$ - $2.927,0$ que podem corresponder à sequência de metilas observadas (BARBOSA, L. C. A., 2007; PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S., 2010).

Figura 38. Espectro de absorção na região do Infravermelho da substância caracolamida A, MeOH

A análise de RMN de ^1H (Anexo A-Figuras 69 e 70) em CD_3OD revelou deslocamentos químicos de δ 7,18-7,26 compreendendo cinco hidrogênios fenílicos, consistindo de um anel aromático monosubstituído. Os hidrogênios na posição *orto* em relação a substituição (H-4' e H-8') mostraram correlações claras no HMBC (Anexo A-Figura 85) com o grupo metileno benzílico [C-2' (δ 36,5; δ 2,77, ($J = 7,3$ Hz), 2H). O CH_2 -2' foi determinado como sendo adjacente a um grupo metilênico desblindado [CH_2 -1', δ 3,39 ($J = 7,3$ Hz), 2H], devido a uma correlação observada no espectro de COSY (Anexo A-Figura 83). Além disso, foi observada uma correlação de CH_2 -1' no espectro de HMBC com o carbono quaternário do sistema aromático (δ 140,5, C-3'). O deslocamento químico de CH_2 -1', indicou uma ligação com um átomo de N e mostrou ainda correlação no espectro de HMBC para δ 176,0 (C-1), definindo uma porção da feniletilamida (**a**), Figura 39. Além disso, após a análise da amostra em ^1H em CDCl_3 , foi possível observar uma troca de hidrogênio em δ 5,34, relacionado com o NH. Através do deslocamento químico observado em δ 2,16 e ligado a carbono δ 36,9 por HMBC foi possível observar a correlação com o carbono da carbonila (Anexo A-Figuras 81-86).

Uma sequência de metilenos foi determinada por ^1H - ^1H COSY (Anexo A-Figura 83) correlacionando os carbonos e hidrogênios onde foi observado um deslocamento químico em δ 2,16 ligado a um multipeto em δ 1,55 também conectado com outro multipeto em δ 1,27 próximo a δ 1,40 com constante de acoplamento $J = 7,8$ Hz, o qual está ligado a um triplete em δ 2,17 com $J = 7,3$ Hz até

o hidrogênio olefínico δ 5,94 ($J = 7,46$ Hz), o qual apresentou um tripleto no espectro. Um carbono quaternário foi observado em δ 120,8, o qual era quase imperceptível no RMN de ^{13}C (Anexo A-Figura 82), entretanto, CH_2 -6 mostrou uma correlação clara com este carbono no HMBC (Anexo A-Figura 85). O deslocamento químico indicou uma porção vinílica clorada, a qual é diclorada para satisfazer a determinação da fórmula molecular e a natureza quaternária do átomo de carbono. Assim, a subestrutura de **b** foi determinada (Figura 39).

Figura 39. Estrutura parcial da substância caracolamide A (a e b) conectados por HMBC (flechas)

As correlações de COSY e HMBC podem ser vistas na Figura 39 e os deslocamentos químicos observados estão na tabela 14.

Figura 40. Correlações de COSY e HMBC da substância caracolamide A

As subestruturas **a** e **b** (Figura 39) foram conectadas para formar a estrutura de (**47**), Figura 41, pela observação de uma correlação no espectro de HMBC de CH_2 -1' a C-1.

Figura 41. Estrutura da substância inédita caracolamide A **47****Tabela 14.** Dados de RMN 1-D e 2-D para caracolamide A em CD₃OD

C	δ_H^a (mult.) (J in Hz)	δ_C^a	HMBC^b	COSY^b (H→C)
1		176,0; Cq		
2	2,16 (t, 7,5, 2H)	36,9	1; 3; 4	3
3	1,55 (pent, 7,5, 2H)	26,7	1; 2; 4; 5	2; 4
4	1,27 (m, 2H)	29,6	2; 3; 6	3; 5
5	1,40 (pent, 7,5, 2H)	28,8	3; 6; 7	4; 6
6	2,17 (t, 7,4, 2H)	30,4	4; 5; 7; 8	5; 7
7	5,94 (t, 7,4, 1H)	131,4	5	6
8		120,8; Cq		
1'	3,39 (t, 7,3, 2H)	41,96	1; 2'; 3'	2'
2'	2,77 (t, 7,3, 2H)	36,5	1'; 3'; 4'; 8'	1'
3'		140,5; Cq		
4', 8'	7,20 (d, 7,4, 1H)	129,8	2'; 4'; 6'; 8'	5'; 7'
5', 7'	7,26 (d, 7,4, 1H)	129,4	3'; 5'; 7'	4'; 8'
6'	7,18 (t, 7,4, 1H)	127,3	4'; 8'	

^a 125 MHz para ¹³C; ^b 600 MHz.

A fórmula molecular foi determinada sendo C₁₆H₂₁Cl₂NO (*m/z* 336,08983 [M + Na]⁺; calculada para *m/z* 336,08924, com erro de 1,8 ppm) com padrão isotópico (*m/z* 336/338/340), em uma proporção de 9:6:1 (Anexo A-Figura 86), a qual foi suportada pela presença de dois átomos de cloro na substância (Figura 41). De acordo com a fórmula molecular obtida, esta possui seis graus de insaturação. A substância possui UV de 224 nm.

Essa substância foi observada na rede molecular em um grupo de substâncias desconhecidas (Figuras 36 e 42), as quais não tiveram sua m/z reconhecida pelos bancos de dados. Sua m/z foi observada no valor de 315,048, o programa algumas vezes faz uma média dos valores dos picos próximos e aparece como um valor que difere em uma unidade do valor observado no espectro para a substância. Alguns valores observados próximos a este em m/z 304,338 e m/z 318,899, podem ser de possíveis análogos. Os traços mais espessos mostram as substâncias mais semelhantes entre si, a coloração verde representa a linhagem *Symploca* sp. A2143

Figura 42. Grupo de substâncias observado na rede molecular pertencente à substância inédita caracolamida A, m/z 315,048

Metabólitos previamente isolados no laboratório do Prof. Dr. William Gerwick são similares a caracolamida A e possuem características como a porção de feniletilamina mais o grupo acil amida, o qual pode ser observado em santacruzamate A (**48**), destacando a atividade inibidora de HDAC (PAVLIK et al., 2013). Jantielamida A (**49**) e kimbeamida A (**50**) tem em comum com a nova substância isolada uma porção vinílica contendo cloro e eles bloqueiam canais de sódio moderadamente em células de ratos Neuro-2a, Figura 43 (NUNNERY et al., 2012).

Deste modo, também semelhante ao novo metabólito está a substância credneramida A (**51**) (Figura 43), a qual possui os mesmos grupos encontrados em

caracolamida A, como a porção de feniletilamina, o grupo acil amida e a porção vinílica com cloro, diferenciada pela presença de duas duplas ligações em credneramidas e dois cloros na dupla terminal em caracolamida A, esta é uma característica especial da nova estrutura (MALLOY et al. 2012).

Figura 43. Substâncias com grupos químicos semelhantes a substância inédita caracolamida A

4.10 Avaliação das atividades biológicas das substâncias isoladas 4,6,8,10,12,14,16,18,20,22-decimetóxi-heptacos-1-eno e de caracolamida A

4.10.1 Avaliação das atividades antiparasitárias

As substâncias 4,6,8,10,12,14,16,18,20,22-decimetóxi-heptacos-1-eno e de caracolamida A não foram ativas contra *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*.

A fração E foi ativa contra malária e as frações E e F contra Doença de Chagas nos testes iniciais com os extratos brutos e frações, o que demonstra que esta não é a substância responsável pela atividade biológica encontrada.

4.10.2 Ensaio citotóxico em linhagens H460

As substâncias testadas 4,6,8,10,12,14,16,18,20,22-decametóxi-heptacos-1-eno e de caracolamida A não apresentaram atividade citotóxica.

4.10.3 Monitoramento intracelular dos canais de Ca^{2+} em neurônios

As oscilações de Ca^{2+} apresentam um importante papel fisiológico no sistema nervoso. Têm sido relatadas oscilações de Ca^{2+} que ocorrem no neocórtex, no hipocampo e nas células granulares do cerebelo. Uma importante função destas oscilações espontâneas é que provocam a regulação da plasticidade neural no desenvolvimento de neurônios e também a comunicação entre eles (CAO et al., 2010).

A tetrodoxina foi utilizada como controle negativo, onde foi possível observar que após a sua adição, as oscilações de cálcio são inibidas. A veratidina foi usada como controle positivo e produziu um aumento das oscilações de cálcio, sustentando um fluxo de pico único (Figuras 44-45).

Nas figuras (44 e 45) foi possível verificar que a substância caracolamida A ocasionou uma inibição das oscilações dos canais de Ca^{2+} em 2 min nas concentrações de 0,01 nm a 1000 nm.

Na Figura 46 constatou-se que a o padrão feniletilamina causou inibição da oscilação dos canais de Ca^{2+} em 2 min nas concentrações de 0,01 nm a 100 nm.

De acordo com os resultados obtidos, a substância caracolamida A e o padrão feniletilamina são biologicamente ativos em concentrações sub-nanomolares e apresentam efeitos similares na oscilação de amplitude e frequência.

Feniletilamina (FEA)

52

Feniletilamina (FEA) (**52**) é uma amina endógena sintetizada no cérebro, a qual possui função neuromoduladora e está envolvida na fisiopatologia de distúrbios neurológicos como depressão, esquizofrenia e hiperatividade (KITAMURA et al., 2008). É ela que propicia ao cérebro energia, foco, bom-humor,

motivação, prazer e é um estimulante dos neurotransmissores do cérebro promovendo maior desempenho, bem-estar, envelhecimento lento (KAUR; KUMARI, 2016).

Derivados de FEA tem um papel bem reconhecido na fisiologia dos mamíferos como um neurotransmissor endógeno que tem mostrado se ligar a receptores com traços de amina (TAAR), neurotransmissores dopaminérgicos e receptores GABA. Por meio da ligação com estes receptores, os derivados da feniletilamina são capazes de modular maior função cognitiva e agem como estimulantes, antidepressivos e alucinógenos (MALLOY et al., 2012; KAUR; KUMARI, 2016).

Drogas já isoladas, as quais possuem traços de feniletilamina, apresentam efeitos farmacológicos antidepressivos, anti-histamínicos, vasoconstritores e anti-hipertensivos (MALLOY et al., 2012; IRSFELD; SPADAFORÉ; PRÜß, 2014).

Feniletilamina já foi isolada de organismos marinhos como octocorais além de outras espécies de cianobactérias marinhas (MALLOY et al., 2012).

A espécie de cianobactéria cf. *Trichodesmium* sp. possui dois constituintes químicos, as credneramidas A e B mencionadas anteriormente, com atividade neuromoduladora de inibição das oscilações dos canais de Ca^{2+} em neurônios cérebro-corticais de ratos, também com atividade micromolar, as estruturas são semelhantes a caracolamida A, a qual também apresentou a mesma atividade (MALLOY et al., 2012).

A substância Palmyrolida A isolada da espécie *Palmyra atoll*, apresentou atividade supressora das oscilações dos canais de Ca^{2+} em neurônios cérebro-corticais de ratos (PEREIRA et al., 2010). Extraída de duas espécies ambientais em associação *Lyngbya majuscula* e *Phormidium gracile*, o metabólito Hoiamida A demonstrou potente atividade inibidora das oscilações dos canais de Ca^{2+} (PEREIRA et al., 2009).

Figura 44. **A:** Tetrodotoxina (1 μ M), controle negativo. **B-G:** Representação da relação da resposta entre tempo e concentração para mudanças em oscilações de Ca^{2+} em neurônios neocorticais induzidas por caracolamida A. **H:** Veratridina (30 μ M), controle positivo. Dados representativos de 2 experimentos em 10 replicatas por dose de experimento

Figura 45. **A:** Tetrodotoxina (1 μ M), controle negativo. **B-G:** Representação da relação da resposta entre tempo e concentração para mudanças em oscilações de Ca^{2+} em neurônios neocorticais induzidas por caracolamida A. **H:** veratridina (30 μ M), controle positivo. Dados representativos de 2 experimentos em 5 replicatas por dose de experimento

Figura 46. **A:** Tetrodotoxina (1 μ M), controle negativo. **B-G:** Representação da relação da resposta entre tempo e concentração para mudanças em oscilações de Ca^{2+} em neurônios neocorticais induzidas pelo padrão feniletilamina. **H:** Veratridina (30 μ M), controle positivo. Dados representativos de 2 experimentos em 5 replicatas por dose de experimento

Feniletilamina está sendo sugerida com uma droga que possa substituir outras como as anfetaminas, que possuem diversos efeitos colaterais desagradáveis. Seus efeitos farmacológicos podem ser úteis no tratamento de muitas doenças que foram citadas anteriormente, como depressão, hiperatividade, etc. (KAUR; KUMARI, 2016).

A substância caracolamida A quando comparada à FEA teve efeitos similares na oscilação e frequência dos canais de Ca^{2+} em concentrações subnanomolares, esse resultado torna essa substância interessante e relevante para futuros estudos farmacológicos, sendo um candidato potencial para o desenvolvimento de uma droga terapêutica.

4.11 CONCLUSÕES

Neste trabalho foram investigadas nove espécies do gênero *Symploca* quanto à análise química e de atividades biológicas.

A utilização de redes moleculares (molecular networking) em produtos naturais vêm-se mostrando como uma ferramenta auxiliar de ampla utilidade na investigação de metabólitos secundários, sendo eles conhecidos ou não.

Por meio da análise dos dados da rede molecular realizada com as nove espécies foram identificadas três substâncias conhecidas: apratoxina A, palmiramida A e curacina D. Estas, foram analisadas com relação à CLAE-EM/EM, tempo de retenção, íon molecular e fragmentações e comparadas com padrões já isolados no laboratório do Prof. Dr. William Gerwick.

Os ensaios biológicos iniciais realizados com extratos brutos e frações contra doenças tropicais e em linhagens de câncer de mama revelaram ser ativos em várias das amostras testadas. Essas atividades devem ser investigadas após isolamento das substâncias para avaliar qual está ocasionando a mesma.

Através da avaliação dos dados químicos (CLAE-EM/EM, rede molecular e RMN), do screening biológico e da quantidade de amostra foram selecionadas para dar início ao isolamento químico as frações A2143 E, F e G, das quais foram obtidos dois metabólitos secundários um conhecido denominado de 4,6,8,10,12,14,16,18,20,22-decametóxi-heptacos-1-eno e um inédito denominado de caracolamida A.

A substância inédita caracolamida A, apresenta uma porção vinílica ligada a dois cloros, o que a torna distinta das outras substâncias já isoladas no laboratório e com porções semelhantes a ela como, santacruzamate A, jantielamida A, kimbeamida A e credneramida A.

Após a obtenção dos metabólitos, estes foram testados contra *L. donovani*, *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei* e atividade citotóxica contra linhagens de câncer de pulmão, não demonstrando atividade.

A substância caracolamida A juntamente com o padrão avaliado feniletilamina tiveram atividade neuroativa, inibindo as oscilações de cálcio em células neuronais, esse ensaio permite que também sejam avaliadas futuramente em outros ensaios avaliando o influxo de Na⁺ e Ca²⁺ dentro da célula.

Os resultados abrem portas para um estudo farmacológico mais aprofundado da substância inédita isolada, já que muitas drogas comercializadas hoje em dia possuem traços de feniletilamina em suas estruturas, com funções antidepressiva e anti-histamínica, por exemplo.

O presente trabalho viabilizou a análise de uma série de linhagens do gênero *Symploca* o que possibilitou a triagem biológica, a investigação química e a obtenção das substâncias identificadas, sendo uma inédita.

Este trabalho possibilitou o acréscimo de dados ao gênero com resultados inéditos obtidos, mostrando que o mesmo possui um grande potencial na descoberta de substâncias novas com características distintas e intrigantes, como vêm sendo relatado ao longo dos anos; além disso, as substâncias já isoladas em outros estudos apresentaram atividades biológicas de importância.

Os resultados obtidos favorecem a perspectiva da continuidade desses estudos, tanto pela nova substância isolada, a qual poderá ser sintetizada e avaliada em diferentes ensaios biológicos quanto pela continuidade da investigação química e também biológica das demais frações, as quais foram selecionadas por meio da rede molecular com potencial perspectiva de possuírem metabólitos inéditos.

Sendo assim, este trabalho contém dados que enriquecem a área de Produtos Naturais Marinhos, os quais também podem ser inseridos na plataforma da GNPS, contribuindo com o banco de dados da mesma.

5. REFERÊNCIAS

- AH, A. H.; DEBBAB, A. EDRADA-EBEL, R. A.; MÜLLER, W. E. G.; KUBBUTAT, M. H. G.; WRAY, V.; EBEL, R.; PROSKSCH, P. Protein kinase inhibitors and other cytotoxic metabolites from the fungal endophyte *Stemphylium botryosum* isolated from *Chenopodium album*. **Mycosphere**. v. 1; p. 153-62, 2010.
- ALLARD, P. M.; PÉRESSE, T.; BISSON, J.; GINDRO, K.; MARCOURT, L.; PHAM, V. C.; ROUSSI, F.; LITAUDON, M.; WOLFENDER, J.-L. Integration of Molecular Networking and In-Silico MS/MS Fragmentation for Natural Products Dereplication. **Anal. Chem.**, v. 88, n. 6, p. 3317–23, 2016.
- ALVARENGA, D. O.; RIGONATO, J.; BRANCO, L. H. Z.; FIORE, M. F. Cyanobacteria in mangrove ecosystems. **Biodivers. Conserv.**, v. 24, p. 799-817, 2015.
- ANGELIS, S.; NOVAK, A. C.; SYDNEY, E. B.; SOCCOL, V. T.; CARVALHO, J. C.; PANDEY, A.; NOSEDA, M. D.; THOLOZAN, J. L.; LORQUIN, J.; SOCCOL, C.R. Co-Culture of microalgae, cyanobacteria, and macromycetes for exopolysaccharides production: process preliminary optimization and partial characterization. **Appl. Biochem Biotechnol.**, v. 167, p.1092–1106, 2012.
- ARÁOZ, R.; MOLGÓ, J.; TANDEAU DE MARSAC, N. Neurotoxic cyanobacterial toxins. **Toxicon**. v. 56, n. 5, p. 813-28, 2010.
- ARAÚJO, L.W.; LIMA, S.O.A.; AZEVEDO, L.J.; MARCON. J.; SOBRAL, K.J.; LAVACA, T.P. **Manual: Isolamento de Micro-organismos Endofíticos**, Piracicaba: Ed. USP-ESALQ. 2002, 86p.
- BANKER, R.; TELTSCH, B.; SUKENIK, A.; CARMELI, S. 7-Epicylindrospermopsin, a toxic minor metabolite of the cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum* from Lake Kinneret, Israel. **J. Nat. Prod.** v. 63, p. 387-89, 2000.
- BARBOSA, L. C. A. **Espectrometria no Infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. Editora UFV,, 2007, 188 p.
- BHARATE, S. B.; MANDA, S.; JOSHI, P.; SINGH, B.; VISHWAKARMA, R. A. Total synthesis and anti-cholinesterase activity of marine-derived bis-indole alkaloid fascaplysin. **Med. Chem. Commun.**, v. 3, p. 1098–1103, 2012.
- BELLÉM, F.; NUNES, S.; MORAIS, M. Cyanobacteria toxicity: Potential public health impact in South Portugal populations. **J. Toxicol. Env. Health, Part A: Current issues**. v. 76, p. 263-71, 2013.
- BERLINCK, R. G. S.; HAIDU, E.; ROCHA, R. M.; OLIVEIRA, J. H. H. L.; HERNANDEZ, I. L. C.; SELEGHIM, M. H. R.; GRANATO, A. C.; ALMEIDA, E. V. R.; NUNEZ, C. V.; MURICY, G.; PEIXINHO, S.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; CAVALCANTI, B. C.; NASCIMENTO, G. G. F.; THIEMANN, M. S.; SOUZA, A. O.;

SILVA, C. L.; MINARINI, P. R. R. Challenges and rewards of research in Marine Natural Products chemistry in Brazil. **J. Nat. Prod.** v. 67, p. 510-22, 2004.

BERTRAND, S.; BOHNI, N.; SCHNEE, S.; et al. Metabolite induction via microorganism co-culture: A potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. **Biotechnol. Adv.**, v. 32, p. 1180-1204, 2014.

BHAKUNI, D. S.; RAWAT, D. S. Bioactive metabolites of marine algae, fungi and bacteria. In: BHAKUNI, D. S.; RAWAT, D. S. (eds). **Bioactive Marine Natural Products**. ed. Springer, New York, 2005, p. 1-25.

BLUNT, J.; BUCKINGHAM, J.; MUNRO, M. Taxonomy and Marine Natural Products Research. In: FATTORUSSO, E.; GERWICK, WH; TAGLIALATELA-SCAFATI, O. (eds.). **Handbook of marine natural products**,1. ed. Springer, Dordrecht, Heidelberg, New York, London, 2012, p. 3-54.

BLUNT, J.; MUNRO, M.; UPJOHN, M. The Role of Databases in Marine Natural Products Research. In: FATTORUSSO, E.; GERWICK, WH; TAGLIALATELA-SCAFATI, O. (eds.). **Handbook of marine natural products**,1. ed. Springer, Dordrecht, Heidelberg, New York, London, 2012, p. 389-420.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; KEYZERS, R. A; MUNRO, M. H. G.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Nat. Prod. Rep.**, v. 29, n. 2, p. 144–222, 2012.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; KEYZERS, R. A; MUNRO, M. H. G.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Nat. Prod. Rep.**, v. 30, n. 2, p. 237–323, 2013.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; KEYZERS, R. A; MUNRO, M. H. G.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Nat. Prod. Rep.**, v. 31, n. 2, p. 160–258, 2014.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; KEYZERS, R. A.; MUNRO, M. H. G.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Nat. Prod. Rep.**, v. 32, n. 2, p. 116–211, 2015.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; KEYZERS, R. A.; MUNRO, M. H. G.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Nat. Prod. Rep.**, v. 33, n. 3, p. 382–431, 2016.

BOUDREAU, P. D.; BYRUM, T.; LIU, W-T.; DORRESTEIN, P. C.; GERWICK, W. H. Viequeamide A, a cytotoxic member of the kulolide superfamily of cyclic depsipeptides from a marine button cyanobacterium. **J. Nat. Prod.** v. 75, n. 9, p. 1560-70, 2012.

CABRITA, M. T.; VALE, C.; RAUTER, A. P. Halogenated compounds from marine algae. **Mar. Drugs.**, v. 8, p. 2301-17, 2010.

CAO Z.; GEORGE J.; GERWICK W. H.; BADEN D. G.; RAINIER J. D.; MURRAY T. F. Influence of lipid-soluble gating modifier toxins on sodium influx in neocortical neurons. **J. Pharmacol. Exp Ther.** v. 326, n. 2, p. 604-13, 2008.

CAO Z.; LEPAGE, K. T.; FREDERICK M. O.; NICOLAOU K. C.; MURRAY T. F. Involvement of caspase activation in azaspiracid-induced neurotoxicity in neocortical neurons. **Toxicol. Sci.** v. 114; n. 2, p. 323-34, 2010.

CARMICHAEL, W. W. Cyanobacteria secondary metabolites- the cyanotoxins. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 72, p. 445-59, 1992.

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

CHATCHAWAN, T.; KOMÁREK, J.; STRUNECKÝ, O.; ŠMARDÁ, J.; PEERAPORNPIPAL, Y. *Oxynema*, a new genus separated from the genus *Phormidium* (Cyanophyta). **Cryptogamie Algol.**, v. 33, n. 1, p. 41–59, 2012.

CHEN, M.; SHAO, C. L.; MENG, H.; SHE, Z. G.; WANG, C. Y. Anti-respiratory syncytial virus prenylated dihydroquinolone derivatives from the gorgonian-derived fungus *Aspergillus* sp.. **J. Nat. Prod.**, v. 77, n. 12, p. 2720–724, 2014.

CHOI, H.; PEREIRA, A. R.; CAO, Z.; SHUMAN, C. F.; ENGINE, N.; BYRUM, T.; MATAINAH, T.; MURRAY, T. F.; MANGONI, A.; GERWICK, W. H. The Hoiamides, structurally intriguing neurotoxic lipopeptides from Papua New Guinea marine cyanobacteria. **J. Nat. Prod.**, v. 73, p. 1411-21, 2010.

CHOI, H.; PEREIRA, A. R.; GERWICK, W. The chemistry of marine algae and cyanobacteria. In: FATTORUSSO, E.; GERWICK, WH; TAGLIALATELA-SCAFATI, O. (eds) **Handbook of marine natural products**, 1st edn. Springer, Dordrecht, p. 55–152, 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach, approved guideline. NCCLS document EP6-A. **NCCLS Document EP6-A**, v. 23, n. 16, p. 1–50, 2003.

COATES, R. C.; PODELL, S.; KOROBEYNIKOV, A.; LAPIDUS A.; PEVZNER, P.; SHERMAN, D. H.; ALLEN, E. E.; GERWICK, L.; GERWICK, W. H. Characterization of cyanobacterial hydrocarbon composition and distribution of biosynthetic pathways. **PLoS ONE**. v. 9, n. 1, p. 1-12, e85140, 2014.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Nature: A vital source of leads for anticancer drug development. **Phytochem. Rev.**, v. 8, n. 2, p. 313–31, 2009.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670-95, 2013.

CUNHA-LIGNON, M.; MENGHINI, R. P.; SANTOS, L. C. M.; NIEMEYER-DINÓLA, C.; SCHAEFFER-NOVELLI, Y. Estudos de casos nos manguezais do estado de São Paulo (Brasil): Aplicação de ferramentas com diferentes escalas espaço-temporais. **Revista da Gestão Costeira Integrada**. v.9, n. 1, p. 79-91, 2009.

DAI, J.; KROHN, K.; FLÖRKE, U.; PESCIPELLI, G.; KERTI, G.; PAPP, T.; KÖVÉR, K. E.; BÉNYEI, A. C.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B.; KURTÁN, T. Curvularin-Type metabolites from the fungus *Curvularia* sp. isolated from a marine alga. **Eur. J. Org.** p. 6928-37, 2010.

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

DE FELÍCIO, R.; DE ALBUQUERQUE, A.; YOUNG, M. C. M.; YOKOYA, N. S.; DEBONSI, H. M. Trypanocidal, leishmanicidal and antifungal potential from marine red alga *Bostrychia tenella* J. Agardh (Rhodomelaceae, Ceramiales). **J. Pharm. Biomed. Anal.** v. 52, p. 763-69, 2010.

DE FELÍCIO, R. **Produtos naturais marinhos: isolamento e identificação demetabólitos inéditos a partir de fungos endofíticos e cianobactérias utilizando técnicas de eliciação química epigenética e desreplicação via redes moleculares.** 2014. 183 p. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências). Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, São Paulo.

DE LA TORRE; PRIEGO-CAPOTE, F.; DE CASTRO, M. D. L.. Comparison of the volatile profile of vine-shoots and oak chips by headspace-gas chromatographymass spectrometry. **Anal. Methods**. v. 7, p. 1758-69, 2015.

DRAVID, S. M.; MURRAY, T. F. Spontaneous synchronized calcium oscillations in neocortical neurons in the presence of physiological $[Mg^{2+}]$: Involvement of AMPA/kainate and metabotropic glutamate receptors. **Brain Res.**, v. 1006, n. 1, p. 8–17, 2004.

DUARTE, K.; ROCHA SANTOS, T. A. P.; FREITAS, A. C.; DUARTE, A. C. Analytical tehcniques for Discovery of bioactive compounds from marine fungi. **Trends Analyt Chem.**, v. 34, 2012.

ENGINE, N.; PAUL, V. J.; BYRUM, T.; et al. Five chemically rich species of tropical marine cyanobacteria of the genus *Okeania* gen. nov. (Oscillatoriales, Cyanoprokaryota). **J. Phycol.**, v. 49, n. 6, p. 1095–1106, 2013.

FARIA, J.; MORAES, C. B.; SONG, R.; et al. Drug discovery for human African trypanosomiasis: identification of novel scaffolds by the newly developed HTS SYBR Green assay for *Trypanosoma brucei*. **J. Biomol. Screen.**, v. 20, n. 1, p. 70–81, 2015.

FELLER, I. C.; LOVELOCK, C. E.; BERGER, U.; et al. Biocomplexity in mangrove ecosystems. **Annu. Rev. Mar. Sci.**, v. 2, p. 395–417, 2010.

GALONIĆ, D. P.; VAILLANCOURT, F. H.; WALSH, C. T. Halogenation of unactivated carbon centers in natural product biosynthesis: Trichlorination of leucine during barbamide biosynthesis. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 128, n. 12, p. 3900–01, 2006.

GERWICK, W. H.; COATES, C. R.; ENGINE, N.; GERWICK, L.; GRINDBERG, R. V.; JONES, A.; SORRELS, C. M. Giant marine cyanobacteria produce exciting potential pharmaceuticals. **Microbe**. v. 3, n. 6, p. 277-84, 2008.

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

GERWICK, W. H.; FENNER, A. M. Drug discovery from marine microbes. **Microb. Ecol.** v. 65, p. 800-06, 2013.

GRAM, L. Silent clusters-Speak up! **Microb. Biotechnol.** v. 8, n. 1, p. 13-4, 2015.

GREVE, H.; SCHUPP, P. J.; EGUEREVA, E.; KEHRAUS, S.; KELTER, G.; MAIER, A.; HEINZ-HERBERT, F.; KÖNIG, G. M. Apralactone A and a new stereochemical class of curvularins from the marine fungus *Curvularia* sp. **Eur. J. Org. Chem.**, n. 30, p. 5085–92, 2008.

GUIRY, M. D. & GUIRY, G. M. 2015. *Algae Base*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Disponível em: <http://www.algaebase.org>. Acesso: 23 abr. 2015, 14 DEZ 2015, 22 jun 2016.

GUNASEKERA, S. P.; IMPERIAL, L.; GARST, C.; RATNAYAKE, R.; DANG, L. H.; PAUL, V. J.; LUESCH, H. Caldoramide, a modified pentapeptide from the marine cyanobacterium *Caldora penicillata*. **J. Nat. Prod.**, v. 79, n. 7, p. 1867-71, 2016.

HAGA, A.; TAMOTO, H.; ISHINO, M.; et al. Pyridone alkaloids from a marine-derived fungus, *stagonosporopsis cucurbitacearum*, and their activities against azole-resistant *Candida albicans*. **J. Nat. Prod.**, v. 76, n. 4, p. 750–754, 2013.

HAN, B.; MCPHAIL, K. L.; LIGRESTI, A.; DI MARZO, V.; GERWICK, W. H. Semiplenamides A-G, fatty acid amides from a Papua New Guinea collection of the marine cyanobacterium *Lyngbya semiplena*. **J. Nat. Prod.**, v. 66, n. 10, p. 1364–68, 2003.

HERTWECK, C. Hidden biosynthetic treasures brought to light. **Nat. Chem. Biol.**, v. 5, n. 7, p. 450–52, 2009.

IÓCA, L. P.; ALLARD, P.-M.; BERLINCK, R. G. S. Thinking big about small beings - the (yet) underdeveloped microbial natural products chemistry in Brazil. **Nat. Prod. Report.**, v. 31, n. 5, p. 646–75, 2014.

IRSFELD, M.; SPADAFORÉ, M.; PRUSS, B. M. β -phenylethylamine, a small molecule with a large impact. **Webmedcentral**, v. 4, n. 9, p. 1–15, 2013.

JAJA-CHIMEDZA, A.; GANTAR, M.; GIBBS, P. D. L.; SCHMALE, M. C.; BERRY, J. P. Polymethoxy-1-alkene from *Aphanizomenon ovalisporum* inhibit vertebrate development in the Zebrafish (*Danio rerio*) embryo model. **Mar. Drugs**, v.10, p. 2322-36, 2012.

JAJA-CHIMEDZA, A.; SAEZ, C.; SANCHEZ, K.; GANTAR, M.; BERRY, J. P. Identification of teratogenic Polymethoxy-1-alkene from *Cylindrospermopsis raciborskii*, and taxonomically diverse freshwater cyanobacteria and Green algae. **Harmful Algae**, v. 49, p. 156-61, 2015.

JULIANTI, E.; LEE, J. H.; LIAO, L.; et al. New polyaromatic metabolites from a marine-derived fungus *Penicillium* sp. **Org. Lett.**, v. 15, n. 6, p. 1286–1289, 2013.

KAEBERNICK, M.; NEILA, B. A. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. **Microbiology Ecology**. v. 35; p. 1-9; 2001.

KAUR, N.; KUMARI, B. Phenylethylamine: Health benefits: A review. **World J. Pharm. Sci.** v. 5; n. 4, p. 743-50; 2016.

KITAMURA, T.; MUNAKATA, M.; HAGINOYA, K.; TSUCHIYA, S.; IINUMA, K. β -phenylethylamine inhibits K^+ currents in neocortical neurons of the rat: A possible mechanism of beta-phenylethylamine-induced seizures. **Tohoku J. Exp. Med.**, v. 215, n. 4, p. 333–40, 2008.

KOMÁREK, J.; KOMÁRKOVÁ, J.; KLING, H. Filamentous cyanobacteria. In: WEHR, J. D.; SHEALTH, R. G.; KOCIOLEK, J. P.(eds). **Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification**. Academic Press, San Diego, CA, p.117-96, 2003.

KOMÁREK, J. Coccoid and Colonial Cyanobacteria. In: WEHR, J. D.; SHEALTH, R. G.; KOCIOLEK, J. P.(eds). **Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification**. Academic Press, San Diego, CA, p.59–116, 2003.

KOMÁREK, J.; KAŠTVOSKÝ, J.; MAREŠ, J.; JOHANSEN, J. R. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. **Preslia**, v. 86, n. 4, p. 295–335, 2014.

KUMAR, C. G.; MONGOLLA, P.; SUJITHA, P.; JOSEPH, J.; BABU, K. S.; SURESH, G.; RAMAKRISHNA, K. V. S.; PURUSHOTHAM, U.; SASTRY, G. N.; KAMAL, A. Metabolite profiling and biological activities of bioactive compounds produced by *Chrysosporium lobatum* strain BK-3 isolated from Kaziranga National Park, Assam, India. **SpringerPlus**, v. 2, p. 122, 2013.

LEA-SMITH, D. J.; BILLER, S. J.; DAVEY, M. P.; et al. Contribution of cyanobacterial alkane production to the ocean hydrocarbon cycle. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, n. 14, p. 201507274, 2015.

- LEÃO, P. N.; ENGEL, N.; ANTUNES, A.; GERWICK, W. H.; VASCONCELOS, V. The chemical ecology of cyanobacteria. **Nat. Prod. Report**, v. 29, n. 3, p. 372-91, 2012.
- LEÃO, P. N.; COSTA, M.; RAMOS, V.; PEREIRA, A. R.; FERNANDES, V. C.; DOMINGUES, V. F.; GERWICK, W. H.; VASCONCELOS, V. M.; MARTINS, R. Antitumor activity of Hierridin B, a cyanobacterial secondary metabolite found in both filamentous and unicellular marine strains. **Plos one**. v.8, n. 7, e69562, 2013.
- LEE, S. Y.; PRIMAVERA, J. H.; DAHDOUN-GUEBAS, F.; et al. Ecological role and services of tropical mangrove ecosystems: A reassessment. **Global Ecol. Biogeogr.** v. 23, n. 7, p. 726–43, 2014.
- LIAO, L.; LEE, J. H.; YOU, M.; et al. Penicillipyrones A and B, meroterpenoids from a marine-derived *Penicillium* sp. fungus. **J. Nat. Prod.**, v. 77, n. 2, p. 406–10, 2014.
- LIFSHITS, M.; CARMELI, S. Metabolites of *Microcystis aeruginosa* Bloom Material from Lake Kinneret, Israel. **J. Nat. Prod.** v. 75, p. 209-19, 2012.
- LININGTON, R.G.; CLARK, B.R.; TRIMBLE, E.E.; ALMANZA, A.; URENA, L.-D.; KYLE, D.E.; GERWICK, W.H. Antimalarial peptides from marine cyanobacteria: Isolation and structural elucidation of gallinamide A. **J. Nat. Prod.** v. 72, p.14-17, 2009.
- LIU, Y.; LI, X.-M.; MENG, L.-H.; JIANG, W.-L.; XU, G.-M.; HUANG, C.-G.; WANG, B.-G. Bisthiodiketopiperazines and acorane sesquiterpenes produced by the marine-derived fungus *Penicillium adametzioides* AS-53 on different culture media. **J. Nat. Prod.**, v. 78, n. 6, p. 1294–99, 2015.
- LIU, H.; LI, X.-M.; LIU, Y.; ZHANG, P.; WANG, J.-N.; WANG, B.-G. Chermesins A–D: Meroterpenoids with a drimane-type spirosesquiterpene skeleton from the marine algal-derived endophytic fungus *Penicillium chermesinum* EN-480. **J. Nat. Prod.**, v. 79, p. 806-11, 2016.
- LOPES, M.N.; OLIVEIRA, A.C.; YOUNG, M.C.M.; BOLZANI, V.S.; Flavonoids from *Chiococca braquiata* (Rubiaceae). **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 15, n. 4, p. 468-71, 2004.
- LOZA, V.; PERONA, E.; MATEO, P. Molecular fingerprinting of cyanobacteria from river biofilms as a water quality monitoring tool. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 79, n. 5, p. 1459-72, 2012.
- LUESCH, H.; YOSHIDA, W. Y.; MOORE, R. E.; PAUL, V. J.; CORBETT, T. H. Total structure determination of Apratoxin A, a potent novel cytotoxin from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. **J. Am. Chem. Soc.** v. 123, p. 5418-23, 2001.
- MA, H.-G.; LIU, Q.; ZHU, G.-L.; LIU, H.-S.; ZHU, W.-M. Marine natural products sourced from marine derived *Penicillium* fungi. **J. Asian. Nat. Prod. Res.** v. 18, n. 1, p. 92-115, 2016.

MALLOY, K.L.; SUYAMA, T.L.; ENGINE, N.; DEBONSI, H.M.; CAO, Z.; MATAINAH, T.; SPADAFORA, C.; MURRAY, T.F.; GERWICK, W.H. Credneramides A and B: neuromodulatory phenethylamine and isopentylamine derivatives of a vinyl chloride-containing fatty acid from *Trichodesmium* sp. **J. Nat. Prod.** V. 75, p. 60-6, 2011.

MARQUEZ, B.; PINARD-VERDIER, P.; HAMEL, E.; GERWICK, W. H. Curacin D, a mitotic agent from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Phytochem.* v. 49, n. 8, p. 2387-89, 1998.

MARSTON, A.; KISSLING, J.; HOSTETTMANN, K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochem. Anal.**, v. 13, n. 1, p. 51-4, 2002.

MARTÍNEZ-LUIS, S.; CHERIGO, L.; HIGGINBOTHAM, S.; et al. Screening and evaluation of antiparasitic and in vitro anticancer activities of Panamanian endophytic fungi. **Int. Microbiol.**, v. 14, n. 2, p. 95–102, 2011.

MASSÓ I ALEMÁN, S.; BOURGEOIS, C.; APPELTANS, W.; VANHOORNE, B.; DE HAUWERE, N.; STOFFELEN, P.; HEAGHEBAERT, A.; DAHDOUN-GUEBAS, F. The “Mangrove Reference Database and Herbarium”. **Plant Ecology and Evolution**, v. 143, n. 2, p. 225–32, 2010. Disponível em: <http://www.vliz.be/vmdcdata/mangroves/index.php>. Acesso: 16 jun. 2016.

MAYER, A. M. S.; GLASER, K. B.; CUEVAS, C.; JACOBS, R. S.; KERN, W.; LITTLE, R. D.; McINTOSH, J. M.; NEWMAN, D. J.; POTTS, B. C.; SHUSTLER, D. E. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. **Trends Pharmacol. Sci.** v. 31, p. 255-65, 2010.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; McLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 45, p. 31-4, 1982.

MELO, R. S.; NEVES, M. H. B.; BAPTISTA, O. R. Cultivo axênico das cianobactérias marinhas *Aphanothece halophytica* Frémy, 1933 e *Chroococcus minutus* (Kützinger) Nägeli, 1849. **Acta Bot. Bras.** v. 25; n.1; p. 234-40, 2011.

MENG, L. H.; ZHANG, P.; LI, X. M.; WANG, B. G. Penicibrocazines A-E, five new sulfide diketopiperazines from the marine-derived endophytic fungus *Penicillium brocae*. **Mar. Drugs**, v. 13, n. 1, p. 276–87, 2015.

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

MILLER, B.; FRIEDMAN, A. J.; CHOI, H.; HOGAN, J.; McCAMMON, A.; HOOK, V.; GERWICK, W. H. The marine cyanobacterial metabolite gallinamide A is a potent and selective inhibitor of human cathepsin L. **J. Nat. Prod.** v. 77, n. 1, p. 92-9, 2014.

- MOHAMED, A. Z.; MOHAMED, H.; ALAMRI, S. A. Growth inhibition of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* and degradation of its microcystin toxins by the fungus *Trichoderma citrinoviride*. **Toxicon**, v. 86, p. 51-8, 2014.
- MOLINSKI, T. F.; REYNOLDS, K. A.; MORINAKA, B. I. Symplocin A, a linear peptide from the bahamian cyanobacterium *Symploca* sp. configurational analysis of *N, N*-dimethylamino acids by chiral-phase HPLC of naphthacyl esters. **J. Nat. Prod.**, v. 75, n. 3, p. 425–31, 2012.
- MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; et al. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 83, n. 11, p. 757–66, 1991.
- MOON, S.; SIQUEIRA-NETO, J. L.; MORAES, C. B.; YANG, G.; KANG, M.; FREITAS-JUNIOR, L. H.; HANSEN, M. A. E. An image-based algorithm for precise and accurate high throughput assessment of drug activity against the human parasite *Trypanosoma cruzi*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, 2014.
- MORI, Y.; KOHCHI, Y.; NOGUCHI, H.; et al. Isotactic polymethoxy-1-alkenes from the terrestrial blue-green alga *Scytonema ocellatum*: Structure and synthesis. **Tetrahedron**, v. 47, n. 27, p. 4889–4904, 1991.
- MYNDERSE, J. S.; MOORE, R. E. Isocactic polymethoxy-1-alkenes from the blue-green alga *Tolypothrix conglutinata* var. *chlorata*. **Phytochem**, v. 18, p. 1181-83, 1979.
- NAMAN, C. B.; RATTAN, R.; NIKOULINA, S. E.; LEE, J.; MILLER, B. W.; MOSS, N. A.; ARMSTRONG, L.; BOUDREAU, P. D.; DEBONSI, H. M.; VALERIOTE, F. A.; DORRESTEIN, P. C.; GERWICK, W. H. Integratin molecular networking and biological assays to target the isolation of a cytotoxic cyclic octapeptide, samoamide A, from a american samoan marine cyanobacterium. **J. Nat. Prod.** 2017, in press.
- NAKASHIMA, T.; IWATSUKI, M.; OCHIAI, J.; et al. Mangromicins A and B: structure and antitrypanosomal activity of two new cyclopentadecane compounds from *Lechevalieria aerocolonigenes* K10-0216. **J. antibiot.**, v. 67, n. 3, p. 253–60, 2014.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **J. Nat. Prod.**, v. 79, p. 629-61, 2016.
- NICOLETTI, R.; TRINCONE, A. Bioactive compounds produced by strains of *Penicillium* and *Talaromyces* of marine origin. **Mar. Drugs**, v. 14, n. 2, p. 1-35, 2016.
- NUNNERY, J. K.; MEVERS, E.; GERWICK, W. H. Biologically active secondary metabolites from marine cyanobacteria. **Curr. Opin. Biotech.** v. 21, p. 1-7, 2010.
- NUNNERY, J. K.; ENGINE, N.; BYRUM, T.; et al. Biosynthetically intriguing chlorinated lipophilic metabolites from geographically distant tropical marine cyanobacteria. **J. Org. Chem.**, v. 77, n. 9, p. 4198–4208, 2012.

ORHAN, I. E.; OZCELIK, B.; KONUKLUGIL, B.; PUTZ, A.; KABAN, U. G.; PROKSCH, P. Bioactivity screening of the selected Turkish marine sponges and three compounds from *Agelas oroides*. **Rec. Nat. Prod.** v. 6, ed. 4, p. 356 -67, 2012.

PADMAVATHI, A. R.; ABINAYA, B.; PANDIAN, S. K. Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl) of marine bacterial origin inhibits quorum sensing mediated biofilm formation in the uropathogen *Serratia marcescens*. **Biofouling**, v. 30, n. 9, p. 1111–1122, 2014.

PAPAZI, A.; KASTANAKI, E.; PIRINTSOS, S.; KIRIAKOS, K. Lichen symbiosis: Nature's high yielding machines for induced hydrogen production. **PLoS ONE**. v. 10, n. 3, p. 1-22, e0121325, 2015.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN G. M.; KRIZ, G. S. **Introdução a espectroscopia**. 4 ed., 2010, 716 p.

PEREIRA, R. C.; SOARES-GOMES, A. S. **Biologia Marinha**. Editora Interciência, p. 1-4, 2009.

PEREIRA, A.; CAO, Z.; MURRAY, T. F.; GERWICK, W. H. Hoiamide A, a sodium channel activator of unusual architecture from a consortium of two Papua New Guinea cyanobacteria. **Chem. Biol.** v. 16, n. 8, p. 893–906, 2009.

PEREIRA, A. R.; CAO, Z.; ENGINE, N.; et al. Palmyrolide A, an unusually stabilized neuroactive macrolide from *Palmyra atoll* cyanobacteria. **Org. Lett.**, v. 12, n. 20, p. 4490–93, 2010.

PEREIRA, A. R.; KALE, A. J.; FENLEY, A. T.; BYRUM, T.; DEBONSI, H. M.; GILSON, M. K.; VALERIOTE, F. A.; MOORE, B. S.; GERWICK, W. H. The carmaphyccins: new proteasome inhibitors exhibiting an alpha,beta-epoxyketone warhead from a marine cyanobacterium. **Chembiochem**. v. 13, n. 6, p. 810-817, 2012.

RATEB, M.; EBEL, R. Secondary metabolites of fungi from marine habitats. **Nat. Prod. Rep.**, v. 28, p. 290–344, 2011.

REEN, F. J.; GUTIÉRREZ-BARRANQUERO, J. A.; DOBSON, A. D. W.; ADAMS, C.; O'GARA, F. Emerging concepts promising new horizons for marine biodiscovery and synthetic biology. **Mar. Drugs.**, v. 13, n. 5, p. 2924–54, 2015.

RÍOS, V.; PRIETO, A. I.; CAMEÁN, A. M.; GONZÁLEZ-VILA, F. J.; DE LA ROSA, J. M.; VASCONCELOS, V.; GONZÁLEZ-PEREZ, J. A. Detection of cylindrospermopsin toxin markers in cyanobacterial algal blooms using analytical pyrolysis (Py-GC/MS) and thermally-assisted hydrolysis and methylation (TCh-GC/MS). **Chemosphere**, v. 108, p. 175–182, 2014.

RIPPKA, R.; COHEN-BAZIRE, G. The cyanobacteriales: a legitimate order based on the type strain *Cyanobacterium stanieri*? **Ann. Microbiol.**, v. 134B, n. 1, p. 21–36, 1983.

ROBENSON, D. J.; STROBEL, G. A. $\alpha\beta$ -Dehydrocurvularin and curvularin from *Alternaria cinerariae*. **Z Naturforsch.** n. 36: 1081–3, 1981

SALVADOR, L. A.; BIGGS, J. S.; PAUL, V. J.; LUESCH, H. Veraguamides A-G, cyclic hexadepsipeptides from a dolastatin 16-producing cyanobacterium *Symploca* cf. *hydroides* from Guam. **J. Nat. Prod.**, v. 74, n. 5, p. 917–27, 2011.

SALVADOR, L. A.; TAORI, K.; BIGGS, J. S.; JAKONCIC, J. OSTROV, A. O.; PAUL, V. J.; LUESCH, H. Potent elastase inhibitors from cyanobacteria: structural basis and mechanisms mediating cytoprotective and anti-inflammatory effects in bronchial epithelial cells. **J. Med. Chem.** v. 56, n. 3, p. 1276-1290, 2013.

SANT'ANNA, C. L.; AZEVEDO, M. T. P.; AGUJARO, L. F.; CARVALHO, M. C.; CARVALHO, L. R.; SOUZA, R. C. R. **Identificação e contagem de cianobactérias planctônicas de águas continentais brasileiras**. Ed. Interciência, 2006. 58 p.

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

SHAO, C. L.; LININGTON, R. G.; BALUNAS, M. J.; et al. Bastimolide A, a potent antimalarial polyhydroxy macrolide from the marine cyanobacterium *Okeania hirsuta*. **J. Org.**, v. 80, n. 16, p. 7849–55, 2015.

SCHERLACH, K.; HERTWECK, C. Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. **Org. Biomol. Chem.**, v. 7, n. 9, p. 1753–60, 2009.

SCHERLACH, K.; GRAUPNER, K.; HERTWECK, C. Molecular Bacteria-Fungi interactions: Effects on environment food and medicine. **Annu Rev Microbiol.** v. 67, p. 375-97, 2013.

SCHMIDT, N.; ART, J.; FORSCH, I. WERNER, A.; ERKEL, G.; JUNG, M.; HORKE, S.; KLEINERT, H.; PAUTZ, A. The anti-inflammatory fungal compound (S)-curvularin reduces proinflammatory gene expression in an in vivo model of rheumatoid arthritis. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 343, n. 1, p. 106-14, 2012.

SILVA, C. S. P.; GENUARIO, D. B.; VAZ, M. G. M. V.; FIORE, M. F. Phylogeny of culturable cyanobacteria from Brazilian mangroves. **Syst Appl Microbiol.** v. 37, p. 100-12, 2014.

SINGH, R. K.; TIWARI, S. P.; RAI, A. K.; MOHAPATRA, T. M. Cyanobacteria: an emerging source for drug discovery. **J. Antibiot.** v. 64, p. 401-12, 2011.

SIQUEIRA-NETO, J. L.; MOON, S.; JANG, J.; YANG, G.; LEE, C.; MOON, H. K.; CHATELAIN, E.; GENOVESIO, A.; CECETTO, J. FREITAS-JUNIOR, L. H. An

image-based high-content screening assay for compounds targeting intracellular *Leishmania donovani* amastigotes in human macrophages. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 6, n. 6, 2012.

SHAALA, L. A.; YOUSSEF, D. T. A. Identification and bioactivity of compounds from the fungus *Penicillium* sp. CYE-87 isolated from a marine tunicate. **Mar. Drugs.**, v. 13, n. 4, p. 1698–1709, 2015.

SUN, SANG-MI; CHUNG; GYU-HWA; SHIN, TAI-SUN. Volatile compounds of the green alga, *Capsosiphon fulvescens*. **J. Appl. Phycol.** v. 24; p. 1003-13, 2012.

TADESSE, M.; SVENSON, J.; SEPC, K.; TREMBLEAU, L.; ENGQVIST, M.; ANDERSEN, J. H.; JASPARS, M.; STENSVÅ, K.; HAUG, T. Isolation and Synthesis of Pulmonarins A and B, Acetylcholinesterase Inhibitors from the Colonial Ascidian *Synoicum pulmonária*. **J. Nat. Prod.** v. 77; p. 364-69, 2014.

TAN, L. T. Bioactive natural products from marine cyanobacteria for drug discovery. **Phytochem.** v. 68, p. 954-79, 2007.

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

TANIGUCHI, M.; NUNNERY, J. K.; ENGINE, N.; ESQUENAZI, E.; BYRUM, T.; DORRESTEIN, P. C.; GERWICK, W. H. Palmyramide A, a cyclic depsapetide from a Palmyra Atoll collection of the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. **J. Nat. Prod.** v. 73, p. 393-98, 2010.

TARMAN, K.; LINDEQUIST, U.; MUNDT, S. Metabolites of marine microorganisms and their pharmacological activities. . In: KIM, S. (ed) **Marine Microbiology: Bioactive compounds and biotechnological applications**, 1st edn. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, p. 393-416, 2013.

TELLEZ, M. R.; SCHRADER, K. K.; KOBASISY, M. Volatile Components of the Cyanobacterium *Oscillatoria perornata* (Skuja). **J. Agric. Food Chem.** V. 49; p. 5989-92, 2001.

TILLOTSON, J.; BASHYAL, B. P.; KANG, M.; SHI, T.; DE LA CRUZ, F.; GUNATILAKA, A. A. L.; CHAPMAN, E. Selective inhibition of p97 by chlorinated analogues of dehydrocurvularin. **Org. Biomol. Chem.** v. 14, p. 5918-21, 2016.

TRAGER, W.; JENSEN, J. B. Continuous culture of *Plasmodium falciparum*: Its impact on malaria research. **Int. J. for Parasitol.**, v. 27, n. 9, p. 989-1006, 1997.

VAN APELDOORN, M. E.; VAN EGMOND, H. P.; SPEIJERS, G. J. A.; BAKKER, G. J. I. Toxins of cyanobacteria. **Mol. Nutr. Food Res.** v. 51, p. 7-60, 2007.

WANG, M.; CARVER, J. J.; PHELAN, V. V.; SANCHEZ, L. M.; GARG, N. et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 828-37, 2016.

WAGNER, C.; KÖNIG, G. M. Mechanisms of halogenation of marine secondary metabolites. In: FATTORUSSO, E.; GERWICK, W. H.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O. (eds) **Handbook of marine natural products**, 1st edn. Springer, Dordrecht, p. 977-1024, 2012.

WATROUS, J.; ROACH, P.; ALEXANDROV, T.; HEATH, B. S.; YANG, J. Y.; KERSTEN, R. D.; VAN DER VOORT, M.; POGLIANO, K.; GROSS, H.; RAAJIMAKERS, J. M.; MOORE, B. S.; LASKIN, J.; BANDEIRA, N.; DORRESTEIN, P. C. Mass spectral molecular networking of living microbial colonies. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 109, n. 26, p. E1743–52, 2012.

WREDE, D.; MOHAMED, T.; MIRANDA, A. F.; KADALI, K.; STEVENSON, T.; BALL, A. S.; MOURADOV, A. Co-cultivation of fungal and microalgal cells as an efficient system for harvesting microalgal cells, lipid production and wastewater treatment. **PLoS ONE**, v. 24, p. 1-22, 2014.

WoRMS Editorial Board (2016). World Register of Marine Species. Available from <http://www.marinespecies.org> at VLIZ. Accessed 2016-06-19.

YANG, B.; DONG, J.; ZHOU, X.; YANG, X.; LEE, K. J.; WANG, L.; ZHANG, S.; LIU, Y. Proline-Containing Dipeptides from a Marine Sponge of a *Callyspongia* Species. **Helv. Chim. Acta**, v. 92, p. 1112-17, 2009.

YANG, J. Y.; SANCHEZ, L. M.; RATH, C. M.; LIU, X.; BOUDREAU, P. D.; BRUNS, N.; GLUKHOV, E.; WODTKE, A.; FELICIO, R.; FENNER, A.; WONG, W. R.; LININGTON, R. G.; ZHANG, L.; DEBONSI, H. M.; GERWICK, W. H.; DORRESTEIN, P. Molecular networking as a dereplication strategy. **J. Nat. Prod.**, v. 76, n. 9, p. 1686-99, 2013.

XU, Y.; ESPINOSA-ARTILES, P.; SCHUBERT, V.; YA-MING, X.; WEI, Z.; LIN, M. GUNATILAKA, A. L. L.; SÜSSMUTH, R.; MOLNÁRA, I.. Characterization of the biosynthetic genes for 10,11- dehydrocurvularin, a heat shock response-modulating anticancer fungal polyketide from *Aspergillus terreus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 79, n. 6, p. 2038–47, 2013.

XU, J.; JIANG, C.; ZHANG, Z.; MA, W.; GUO, Y. Recent progress regarding the bioactivities, biosynthesis and synthesis of naturally occurring resorcinolic macrolides. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 35, n. 3, p. 316–30, 2014.

ZHAN, J.; GUNATILAKA, A. A. L. Microbial transformation of curvularin. **J. Nat. Prod.**, v. 68, n. 8, p. 1271–73, 2005.

ZEGURA, B.; TRASER, A. S.; FILIPIC, M. Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins – a review. **Mutation Research**. v. 727; p. 16–41; 2011.

ZHENG, C.; CHEN, Y.; JIANG, L. L.; SHI, X. M. Antiproliferative metabolites from the endophytic fungus *Penicillium* sp. FJ-1 isolated from a mangrove *Avicennia marina*. **Phytochem. Lett.**, v. 10, p. 272–275, 2014.

6. ANEXOS

-ANEXO A

Figura 47. Espectro de RMN de ^1H da substância CENA135_A1_3a, $\text{CD}_3\text{OD}+\text{D}_2\text{O}$, 500 MHz

Figura 48. Espectro de RMN de ^1H da substância CENA135_A1_3b, $\text{CD}_3\text{OD}+\text{D}_2\text{O}$, 600 MHz

Figura 49. Mapa de contorno COSY da substância CENA135_A1_3b, CD₃OD+D₂O, 600 MHz

Figura 50. Mapa de contorno HMQC da substância CENA135_A1_3b, CD₃OD+D₂O, 600 MH

Figura 51. Mapa de contorno HMBC da substância CENA135_A1_3b, CD₃OD+D₂O, 600 MH

Figura 52. Espectro de RMN de ^1H da substância CENA135_A1_3_2, $\text{CD}_3\text{OD}+\text{D}_2\text{O}$, 500 MHz

Figura 53. Mapa de contorno COSY da substância CENA135_A1_3_2, CD₃OD+D₂O, 500 MHz

Figura 54. Mapa de contorno HMQC da substância CENA135_A1_3_2, CD₃OD+D₂O, 500 MHz

Figura 55. Mapa de contorno HMBC da substância CENA135_A1_3_2, CD₃OD+D₂O, 500 MHz

Figura 56. Screening do extrato bruto do fungo *P. decaturense* (A) e do extrato bruto da co-cultura do fungo *P. decaturense* e da linhagem de cianobactéria *Cyanobium* sp. CENA181 (B), modo positivo

Figura 57. Screening do extrato bruto do fungo *P. decaturense* (A) e do extrato bruto da co-cultura do fungo *P. decaturense* e da linhagem de cianobactéria *Cyanobium* sp. CENA181 (B), modo negativo

Figura 58. Espectro de RMN de ^1H da substância 10,11-deidrocurvarina, CD_3OD , 500 MHz

Figura 59. Espectro de RMN de ^1H ampliado da substância 10,11-deidrocurvularina, CD_3OD , 500 MHz

Figura 60. Mapa de contorno COSY da substância 10,11-deidrocurvularina, CD₃OD, 500 MHz

Figura 61. Mapa de contorno HMQC da substância 10,11-deidrocurvularina, CD₃OD, 500 MHz

Figura 62. Mapa de contorno HMBC da substância 10,11-deidrocurvularina, CD₃OD, 500 MHz

Figura 63. EM em alta resolução, obtido para substância 10,11-deidrocurvularina a partir da do fungo *Penicillium decaturense*, modo positivo, m/z 291,1201

Figura 64. EM em alta resolução, obtido para substância 10,11-deidrocurvularina a partir da do fungo *Penicillium decaturense*, modo negativo, m/z 289,1113

Figura 65. Espectro de RMN de ^1H da substância curvularina, CD_3OD , 500MHz

Figura 66. Espectro de RMN de ^1H ampliado da substância curvularina, CD_3OD , 500 MHz

Figura 67. Mapa de contorno COSY da substância curvularina, CD₃OD, 500 MHz

Figura 68. Mapa de contorno HMQC da substância curvularina, CD₃OD, 500 MHz

Figura 69. Mapa de contorno HMBC da substância curvularina, CD₃OD, 500 MHz

Figura 70. Espectros de massas em alta resolução a partir do extrato bruto da co-cultura entre o fungo *P. decaturense* e a linhagem de cianobactéria *Cyanobium* sp. CENA181; m/z 315,1171 $[M+Na]^+$, modo positivo

Figura 71. Espectros de massas em alta resolução a partir do extrato bruto da co-cultura entre o fungo *P. decaturense* e a linhagem de cianobactéria *Cyanobium* sp. CENA181; m/z 291,1185 $[M-H]^-$, modo negativo

Figura 72. Espectro do íon molecular (m/z 840,35) do padrão da substância apratoxina A (**A**); seus padrões de fragmentação (**B**) comparação com o íon molecular (m/z 840,74) encontrado na fração 2141H (**C**) e seus padrões de fragmentação comparados com a substância padrão (**D**)

Figura 73. Espectro do íon molecular (m/z 672,14) do padrão da substância palmirâmida A (**A**); seus padrões de fragmentação (**B**) e comparação com o íon molecular (m/z 672,15) encontrado na fração 2228E (**C**) e seus padrões de fragmentação comparados com a substância padrão (**D**)

Figura 74. Espectro do íon molecular (m/z 360,07) do padrão da substância curacina D (A); seus padrões de fragmentação (B) e comparação com o íon molecular (m/z 360,28) encontrado na fração 2136C (C) e seus padrões de fragmentação (D); íon molecular (m/z 360,07) encontrado na fração 2136D (E) e padrões de fragmentação (F)

Figura 75. Íon molecular (m/z 360,31) encontrado na fração 2141C (A) e seus padrões de fragmentação (B); íon molecular (m/z 360,30) encontrado na fração 2143C (C) e seus padrões de fragmentação (D); íon molecular (m/z 360,49) encontrado na fração 2143F (E) e padrões de fragmentação (F) comparados com o padrão curacina D, exibido na Figura 62

Figura 76. Espectro de RMN de ^1H da substância 4,6,8,10,12,14,16,18,20,22-decametóxi-heptacos-1-eno, C_6D_6 , 500 MHz

Figura 77. Espectro ampliado de RMN de ^1H da substância 4,6,8,10,12,14,16,18,20,22-decametóxi-heptacos-1-eno, C_6D_6 , 500 MHz

Figura 78. Espectro de RMN de ^{13}C da substância 4,6,8,10,12,14,16,18,20,22-decametóxi-heptacos-1-eno, C_6D_6 , 125 MHz

Figura 79. EM de alta resolução de 4,6,8,10,12,14,16,18,20,22-decametóxi-heptacos-1-eno, m/z 679,53890 $[M + H]^+$

Figura 80. Espectro de RMN de ^1H da substância caracolamida A, CD_3OD , 600 MHz

Figura 81. Espectro ampliado de RMN de ^1H da substância caracolamida A, CD_3OD , 600 MHz

Figura 82. Espectro de RMN de ^{13}C da substância caracolamida A, CD_3OD , 125 MHz

Figura 83. Mapa de contorno COSY da substância caracolamida A, CD₃OD

Figura 84. Mapa de contorno HSQC da substância caracolamida A, CD₃OD

Figura 85. Mapa de contorno HMBC da substância caracolamida A, CD₃OD

Figura 86. EM em alta resolução, obtido para amostra caracolamida A a partir da linhagem *Symploca* sp., **(B)** modo positivo, m/z 336, 08983 $[M + Na]^+$