

## EXPLORANDO PRODUTOS NATURAIS MICROBIANOS NAS FRONTEIRAS DA QUÍMICA E DA BIOLOGIA

**Luciana Gonzaga de Oliveira**

Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, 13083-970 Campinas – SP, Brasil

**Mônica Tallarico Pupo**

Departamento de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. do Café, s/n, 14040-903 Ribeirão Preto – SP, Brasil

**Paulo Cezar Vieira\***

Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, CP 676, 13560-970 São Carlos – SP, Brasil

Recebido em 26/8/13; aceito em 20/9/13; publicado na web em 16/10/13

EXPLORING MICROBIAL NATURAL PRODUCTS IN THE FRONTIERS OF CHEMISTRY AND BIOLOGY. The chemistry of natural products has been remarkably growing in the past few decades in Brazil. Aspects related to the isolation and identification of new natural products, as well as their biological activities, have been achieved in different laboratories working on this subject in the country. More recently, the introduction of new molecular biology tools has strongly influenced the research on natural products, mainly those produced by microorganisms, creating new possibilities to assess the chemical diversity of secondary metabolites. This paper describes some ideas on how the research on natural products can have a considerable input from molecular biology in the generation of chemical diversity. We also explore the role of microbial natural products in mediating interspecific interactions and their relevance to ecological studies. Examples of the generation of chemical diversity are highlighted by using genome mining, mutasynthesis, combinatorial biosynthesis, metagenomics, and synthetic biology, while some aspects of microbial ecology are also discussed. The idea to bring up this topic is linked to the remarkable development of molecular biology techniques to generate useful chemicals from different organisms. Here, we focus mainly on microorganisms, even though similar approaches have also been applied to the study of plants and other organisms. Investigations in the frontier of chemistry and biology require interactions between different areas, characterizing the interdisciplinarity of this research field. The necessity of a real integration of chemistry and biology is pivotal to finding correct answers to a number of biological phenomena. The use of molecular biology tools to generate chemical diversity and control biosynthetic pathways is largely explored in the production of important biologically active compounds. Finally, we briefly comment on the Brazilian organization of research in this area, the necessity of new strategies for the graduation programs, and the establishment of networks as a way of organization to overcome some of the problems faced in the area of natural products.

Keywords: natural products; molecular biology; chemical ecology; genome mining.

## INTRODUÇÃO

No final do ano de 2012,<sup>1</sup> a SBQ, no seu trabalho de estimular a reflexão de grandes temas de interesse pela comunidade, e tendo como foco o Fórum Mundial da Ciência que ocorrerá na cidade do Rio de Janeiro em novembro de 2013, lançou um documento para nortear a discussão dos vários tópicos que a sociedade julga interessantes para o referido fórum. Entre eles estão: educação (todos os níveis); vida (incluindo fármacos e medicamentos); matérias-primas e materiais, “novos e velhos” (incluindo nanociência e nanomateriais); biodiversidade (incluindo recursos naturais não minerais); energia, água, alimentos e ambiente, inovação e a indústria química. Neste aspecto a Química de Produtos Naturais desempenha um papel de grande importância. Todavia, esta subárea da química requer uma aproximação de outras áreas do conhecimento devido ao seu caráter interdisciplinar. Entre as áreas de destaque nesta interdisciplinaridade está a biologia, mais especificamente, a biologia molecular que contempla uma série de tópicos como: genômica, incluindo *genome mining*, metagenômica, manipulação genética, mutassíntese, biossíntese combinatoria, biologia sintética etc., e a ecologia, com enfoque especial nas relações entre organismos.

Há 6 anos, em um número especial de *Química Nova*,<sup>2</sup> apresentamos uma proposta com ênfase na importância da aproximação dos estudos na área de produtos naturais a uma nova área do conhecimento

conhecida como biologia química. Ressaltamos naquela ocasião que estudos interdisciplinares são da maior relevância para o melhor desenvolvimento da área de produtos naturais. Esta área continua avançando e as novas ferramentas de trabalho surgidas com o desenvolvimento da biologia molecular e dos métodos analíticos que permitem estudos estruturais mais detalhados passaram a propiciar oportunidades valiosas para os estudos de produtos naturais. Autor da frase “*Acredito que o maior desafio da Ciência nesse novo século seja o de tentar entender como a natureza opera através da compreensão de seus mecanismos. A Química tem um papel fundamental nessa história, uma vez que a base dos fenômenos biológicos é química. No entanto, isso exige um esforço concentrado no sentido de unir diferentes disciplinas, como a Química e a Biologia. Sem isso qualquer esforço não terá sucesso*”, o Prof. Otto Gottlieb, um dos mais brilhantes químicos que o Brasil já teve, há tempos ressaltava a importância do estudo interdisciplinar, envolvendo principalmente química e biologia. No seu entendimento, a explicação para muitos dos fenômenos biológicos é encontrada com a química.

A importância da biologia para a química pode ser destacada até mesmo nos nomes de departamentos de química ao redor do mundo, como é o caso das tradicionais Universidade de Harvard e Universidade de Cornell com seus *Department of Chemistry and Chemical Biology*. Além disso, Biologia Química passou a fazer parte de programas de pós-graduação em muitas universidades, como é o caso da Universidade Princeton. Biologia Química é uma área relativamente nova e abrangente, que vai do estudo de enzimologia à química medicinal, e de biologia

\*e-mail: [dpcv@ufscar.br](mailto:dpcv@ufscar.br)

estrutural à proteômica. Como reflexo desta abordagem, é notório também o aparecimento de novas revistas que enfatizam o estudo biológico-químico, como são os “Bio Journals” da American Chemical Society: ACS Chemical Biology em 2006, ACS Synthetic Biology em 2012 e ACS Neuroscience 2012 e outros. Ou ainda, o Integrative Biology de 2009 e publicado pela Royal Society of Chemistry. Certamente, o lançamento dessas revistas revela a importância da integração entre química e biologia para o estudo de inúmeros fenômenos e que esta integração é importante para o desenvolvimento da ciência.

No presente trabalho focalizamos o uso de ferramentas de biologia molecular para um melhor estudo da química de produtos naturais e suas aplicações com a possibilidade de atender, pelo menos parcialmente, aos grandes desafios atuais e futuros do planeta e da humanidade, que são: educação; cidadania plena; mudança climática; produção e qualidade dos alimentos; acesso e qualidade da água; segurança energética; preservação de ecossistemas e das espécies; doenças emergentes e qualidade de vida, que estão destacadas em publicação de recente documento<sup>2</sup> da SBQ. Esta discussão enfatizará especialmente micro-organismos, o que não descarta abordagens semelhantes para outros organismos como plantas e artrópodes.

## DISCUSSÃO

### Histórico

Na virada do século a comunidade de produtos naturais testemunhou o afastamento do interesse da indústria farmacêutica com relação aos metabólitos secundários em função das diversas dificuldades como a frequente redescoberta das mesmas entidades químicas, dificuldades técnicas associadas à purificação e à elucidação estrutural, além de novas abordagens para o acesso rápido a coleções de compostos, como a química combinatória.

Mais recentemente, a importância dos produtos naturais na descoberta de novos fármacos foi revista por diversas razões.<sup>3</sup> Os investimentos na síntese de alto desempenho e síntese combinatória não levaram aos resultados esperados, e, por outro lado, houve também uma evolução nos processos para purificação e caracterização de compostos. Porém, alguns programas de reavaliação de produtos naturais se mostraram bem sucedidos: o policetídeo macrolídico rapamicina, por exemplo, foi inicialmente descoberto como composto antifúngico. Posteriormente, análogos da rapamicina foram identificados por apresentarem excepcional atividade como imunossuppressores na terapia de transplantes<sup>4</sup> e também no tratamento de câncer no fígado.<sup>4</sup> Poliéteres ionóforos como a nigericina e salinomicina despertaram a atenção, recentemente, por apresentarem atividade seletiva sobre células-tronco do câncer.<sup>5</sup>

### Genome Mining como estratégia para a busca de novos produtos naturais

Ainda no final da década de 90, impulsionados pelo Projeto do Genoma Humano, foram iniciados os programas de sequenciamento de diversos organismos, desencadeando os estudos genômicos comparativos. Adicionalmente, houve um grande avanço nas ferramentas que possibilitam a manipulação genética desses organismos assim como do conhecimento detalhado da genética de organismos modelo como *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Streptomyces coelicolor*. Com o estabelecimento destas plataformas tornou-se possível a produção de análogos estruturais por modificação dos genes que codificam módulos e domínios enzimáticos possibilitando a geração de diversidade molecular. Ainda, a rapidez e menor custo associado ao sequenciamento de genomas propiciaram um fôlego novo para alimentar a busca por novos alvos com atividade farmacológica.

As informações reveladas pelo genoma forneceram evidências da elevada capacidade intrínseca dos micro-organismos para a produção de metabólitos secundários. As informações de anotação do genoma proveram subsídios para antecipar os elementos estruturais relacionados a um dado metabólito cognato e decodificar seu maquinário biossintético. Enfim, é possível estabelecer como os genes biossintéticos responsáveis pelas diversas etapas envolvidas na produção de um produto natural específico estão organizados.

*Streptomyces coelicolor* foi o primeiro micro-organismo sequenciado, a partir do qual se pode reconhecer a existência de um número muito maior de etapas biossintéticas codificadas no genoma quando comparado ao número de metabólitos conhecidos. Até a divulgação do genoma de *S. coelicolor* apenas três antibióticos e um pigmento eram conhecidos. Já o genoma revelou a presença de mais de 20 *clusters* que codificavam para pigmentos, lipídeos complexos, moléculas sinalizadoras e sideróforos.<sup>6</sup> Posteriormente, a publicação do sequenciamento de *S. avermitilis*, linhagem produtora da avermectina, indicou a presença de 30 *clusters* biossintéticos.<sup>7</sup> A informação fornecida pelo genoma revelou a existência de um grande número de etapas metabólicas esperando para serem descobertas e evidenciou que a capacidade para a produção de metabólitos por micro-organismos não era completamente acessada sob as condições de cultivo em laboratório. Ou seja, determinados compostos são produzidos apenas em resposta a estímulos físicos, químicos e biológicos específicos. Com esses subsídios muitos grupos de pesquisa em todo o mundo iniciaram um grande programa de *genome mining* na busca por novos produtos naturais e vias biossintéticas.

Atualmente, o uso das sequências genômicas tornou-se uma ferramenta de rotina dos laboratórios em todo o mundo permitindo a identificação de um grande número de *clusters* de genes biossintéticos (órfãos ou crípticos) com o potencial para direcionar a produção de novos produtos naturais, além de possibilitar a elucidação de inúmeras vias biossintéticas. Programas de incentivo para o uso dessa ferramenta como *Genome to Natural Products* do NIH têm impulsionado ainda mais o crescimento da área, que se tornou um campo dinâmico e de rápido avanço. As tecnologias de sequenciamento de próxima geração são hoje bastante acessíveis em termos de preço, rapidez e precisão da informação gerada. Além disso, as plataformas mais amigáveis de apoio ao tratamento dos dados permitem criar uma interface para aplicação desses recursos em qualquer laboratório, permitindo que pesquisas integrativas e sustentáveis se desenvolvam incorporando diversos especialistas.

A base de dados do NCBI<sup>8</sup> mantém dados de sequências e mapas de cerca de 1000 organismos (totalmente sequenciados ou em progresso) dos três principais domínios (Bacteria, Archaea, e Eukaryota), enquanto a base de dados GOLD (Genomes Online) reúne cerca de 7000 projetos completos e 21000 em andamento. Os dados incluem informações de mais de 23000 genomas de bactérias e 600 archeas.<sup>9</sup> O uso de algoritmos como BLAST para alinhamentos e comparação e HMMER para identificação de domínios específicos facilitam a busca de novos *clusters* de genes. Programas como o antiSmash,<sup>10</sup> NRPS predictor,<sup>11</sup> SBSPKS<sup>12</sup> e NP.searcher<sup>13</sup> possibilitam a identificação, anotação e análise de genes biossintéticos. Os dados de sequenciamento permitem categorizar os fungos filamentosos e actinobactérias entre os micro-organismos com maior capacidade genoma-codificada para a produção de metabólitos secundários.

Os genes que codificam para produtos naturais microbianos em geral encontram-se como agrupamentos lineares no genoma juntos a genes responsáveis por modificações (mono-oxigenases, glicosil transferases), genes transcricionais, de transporte e auto-imunidade. Esses fatores em geral facilitam a busca e o estudo das etapas metabólicas. A partir de previsões *in silico* facilitadas pelo crescente número de sequências depositadas em bases de dados é possível prever

diversas funções biológicas. Metodologias baseadas nas especificidades frente a substratos puderam ser refinadas direcionando a busca pelos metabólitos desconhecidos em função de propriedades físico-químicas.<sup>14</sup> Outras estratégias como a deleção de genes associadas a avaliação do perfil metabólico, expressão heteróloga, reconstituição *in vitro* e aproximações genômicas permitiram a descoberta de novos policetídeos, terpenoides e peptídeos não-ribossomais.<sup>15</sup>

Coeliquelina (1), peptídeo não-ribossomal, (NRPS), e orfamida A (2), lipopeptídeo cíclico (Figura 1), são produtos naturais que marcaram o início da utilização de métodos baseados em análise de bioinformática e genômico, respectivamente. Coeliquelina pode ser identificada fazendo-se uso de informações estruturais combinadas a previsões das propriedades físico-químicas do metabólito guiadas pelo genoma de *S. coelicolor*.<sup>15</sup> Já a descoberta da orfamida A, produzida por *Pseudomonas fluorescens* Pf-5, foi direcionada pela previsão de subunidades incorporadas ao longo da biossíntese.<sup>15</sup> Precursores isótopo-marcados estáveis adicionados ao meio de cultivo foram incorporados ao produto natural, facilitando a identificação da molécula de interesse. Em ambos os casos as previsões por bioinformática permitiram a descoberta dos alvos sem a necessidade de qualquer manipulação genética. É importante, entretanto, que os genes de interesse não se encontrem silenciados. Posteriormente, a descoberta da salinilactama (3)<sup>16</sup> de *Salinispora tropica* também foi guiada pela combinação de previsões genoma-guiadas e incorporação de substratos.

A aplicação de outras estratégias como reconstituição *in vitro*, expressão heteróloga e deleção/complementação/avaliação de perfil metabólico obrigatoriamente envolvem manipulação genética. Nas metodologias envolvendo reconstituição *in vitro*, substratos e intermediários são incubados com as enzimas biossintéticas recombinantes e as estruturas dos produtos formados ao longo das etapas individuais podem ser determinadas. A estratégia facilita ainda a elucidação de etapas desconhecidas.

Em um exemplo recente, reconstituição *in vitro* e análise precisa das funções das enzimas codificadas pelo genoma permitiram a elucidação do processo de formação do sistema anel tetronato, presente em antibióticos desta classe.<sup>17</sup> As enzimas participantes da biossíntese das aglomerinas foram expressas individualmente em *E. coli* e a reconstituição *in vitro* evidenciou um mecanismo de desidratação em duas etapas envolvendo O-acilação-eliminação na formação da dupla ligação exocíclica. Estudos análogos permitem transposição dos mecanismos enzimáticos para outros metabólitos mais complexos por comparação das anotações do genoma.

Em algumas situações, o *cluster* de genes identificado por bioinformática encontra-se silenciado. No caso das aspiridonas, como exemplificado pela aspiridona A (4), metabólitos de *Aspergillus nidulans* codificados por um sistema PKS-NRPS identificado por *genome mining*, a biossíntese do produto genoma-codificado não era evidenciada em cultivo.<sup>18</sup> Um promotor apropriado foi utilizado para induzir a expressão do locus *adp* e, fazendo-se a comparação do perfil das linhagens selvagem e mutante, foi possível identificar e caracterizar o produto natural.

O desenvolvimento de ferramentas apropriadas para organizar os *clusters* de genes acima de 40 kb que codificam para determinados metabólitos constituía um obstáculo há poucos anos. No entanto, diversas metodologias de *assembly* foram desenvolvidas em anos recentes permitindo a organização de *clusters* completos por aproximações *in vitro* e *in vivo* e facilitando a utilização da expressão heteróloga de genes crípticos.<sup>19</sup> Outro avanço consiste na introdução de vetores híbridos para a preparação de coleções de cromossomos artificiais (BAC e PAC) facilitando a transferência de *clusters* completos para expressão heteróloga em plataformas bem estabelecidas como *Streptomyces*<sup>20</sup> e *Saccharomyces*.<sup>21</sup>

Laspertomicina (5),<sup>22</sup> holomicina (6),<sup>23</sup> piridomicina (7),<sup>24</sup> chaxamicinas A<sup>25</sup>-D (8-11), emerichelamida A (12)<sup>26</sup> e acetilazonalenina (13),<sup>27</sup> (Figura 1) são apenas alguns exemplos de compostos bioativos derivados das vias NRPS/PKS descobertos por estratégias de *genome mining*.<sup>28</sup> Adicionalmente às vias modulares, as estratégias de *mining* têm possibilitado explorar o terpenoma de diversas bactérias. Utilizando informações do genoma e análises de bioinformática foi possível até o momento identificar inúmeros terpenos cíclicos e elucidar novos mecanismos de ciclização.<sup>29</sup>

A demanda por novos compostos bioativos impulsionou também um grande crescimento em projetos voltados para a exploração de micro-organismos não cultiváveis. Estudos metagenômicos comparativos realizados a partir do sequenciamento do eDNA total permitem a identificação de etapas metabólicas e *clusters* de genes. Adicionalmente, a metagenômica funcional permite a identificação de funções específicas. Limitações relacionadas à baixa expressão em *E. coli* podem ser contornadas pela expressão em outros sistemas como *Streptomyces*, *Pseudomonas* e *Bacillus*, mas diferenças relacionadas a “códon usage”, ausência de elementos regulatórios e envelhecimento ainda caracterizam uma dificuldade a ser ultrapassada.<sup>30</sup>

Pederina (14), onamida (15), briostatina (16) e apratoxina (17) (Figura 2) são exemplos de compostos com atividade antitumoral cuja descoberta foi direcionada por metagenoma. Pederina é um policetídeo produzido por uma bactéria simbiote do besouro *Paederus fuscipes*. O *cluster* de genes híbridos PKS/NRPS responsável pela sua biossíntese foi identificado utilizando-se estratégias de análise guiada pela sequência e biblioteca metagenômica.<sup>31</sup> Mais recentemente, apratoxina A foi identificada a partir do consórcio microbiano de *Lyngbya bouillonii* utilizando biblioteca metagenômica e amplificação de deslocamento múltiplo.<sup>32</sup>

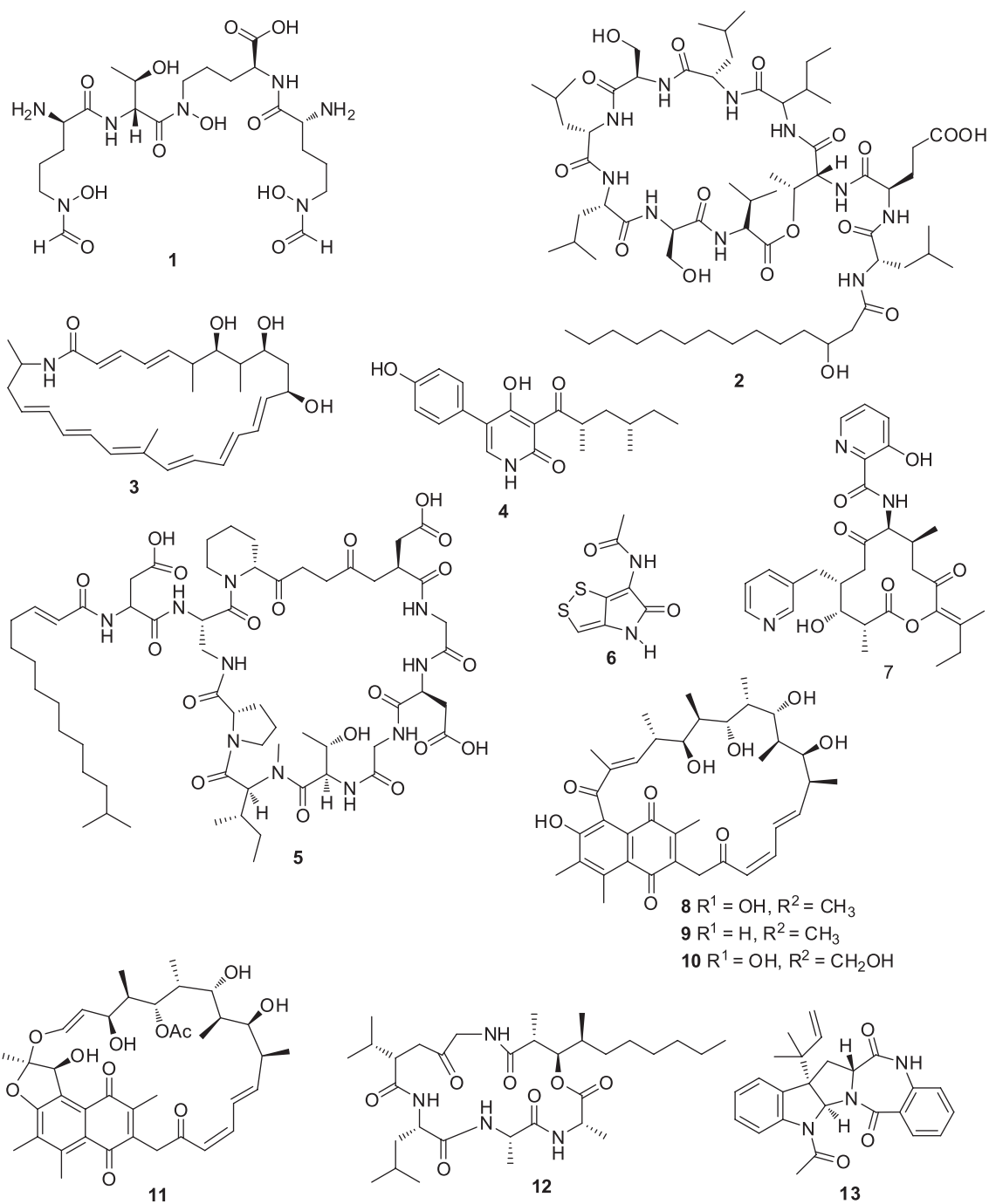
Adicionalmente, estudos de *metagenome mining* podem ser conduzidos para mapeamento de *clusters* de genes biossintéticos não previamente detectados para revelar biomoléculas potencialmente relevantes de diversas fontes,<sup>33</sup> ou ainda para elucidar mecanismos de biossíntese.<sup>34</sup>

As estratégias de *mining* constituem claramente alternativas viáveis para a busca de novas moléculas bioativas, no contexto voltado para a obtenção de substâncias com aplicação terapêutica. No caso de fármacos aprovados como antibióticos, por exemplo, existe um grande desafio em se encontrar moléculas candidatas para possível introdução no mercado, em uma condição onde resistência de micro-organismos patogênicos aos tratamentos existentes é crescente. Como o interesse das grandes indústrias farmacêuticas em fármacos com atividade antibiótica é baixo, a descoberta de novos antibióticos encontra-se a cargo das Universidades e Companhias de Biotecnologia. Esta é uma das frentes que redes de *genome mining* têm atuado como facilitadoras, gerando um arsenal significativamente maior para inspirar a busca por novos compostos ativos.

### Genome mining em plantas

As pesquisas sobre o metabolismo secundário em plantas sempre foram bastante voltadas para a o isolamento, caracterização fitoquímica e definição de etapas metabólicas por estudos biossintéticos com pouca inclusão de estudos bioquímicos moleculares. Recentemente, problemas relacionados à devastação e restrição de coleta, além da importância da preservação dos ecossistemas e das espécies têm direcionado estudos de *genome mining* em plantas.

Muitas vezes em função da pequena quantidade e estabilidade de metabólitos e enzimas de interesse, os estudos realizados requerem o processamento de uma grande quantidade de material além de metodologias sofisticadas de purificação e caracterização que demandam tempo. Um avanço considerável foi atingido em estratégias



**Figura 1.** Produtos naturais microbianos descobertos por estratégias de genome mining

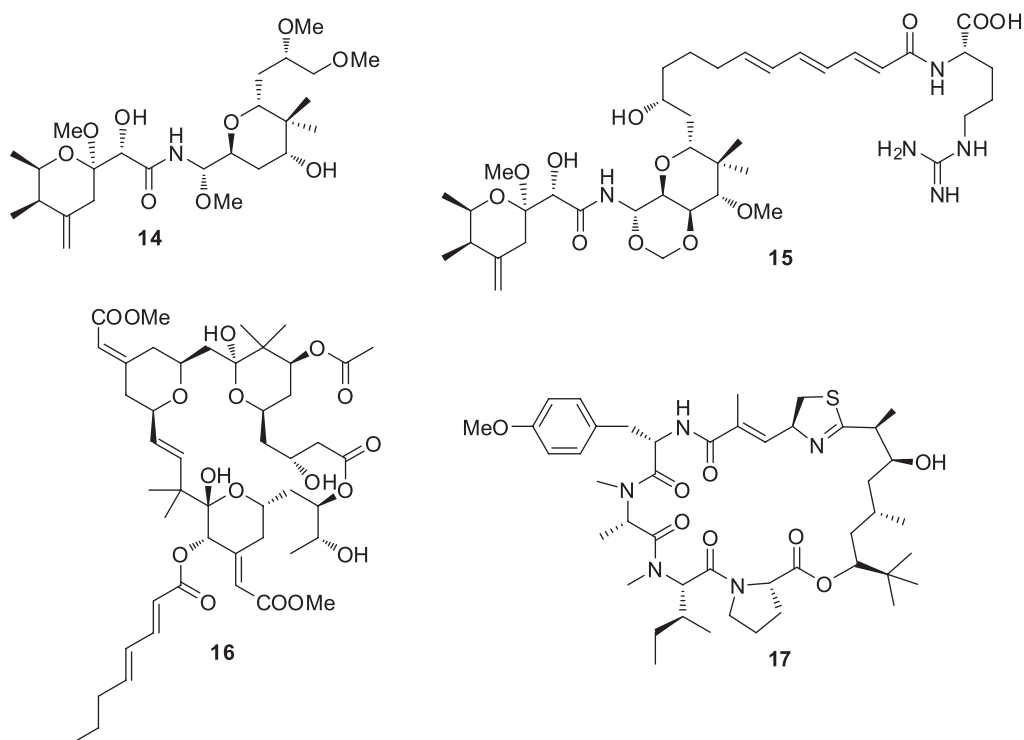
baseadas em biologia molecular de plantas desde o sequenciamento do genoma de *Arabidopsis thaliana* em 2000 e os avanços dos projetos de sequenciamento do arroz. No Brasil existe o interesse econômico específico pela cana de açúcar e soja.

No contexto mundial redes colaborativas foram formadas para sequenciamento de outras plantas, de interesse do agronegócio, frutíferas e medicinais. Atualmente, os dados adquiridos pelo sequenciamento possuem qualidade crescente, assim como o número cada vez maior de organismos completamente ou parcialmente sequenciados e as plataformas para apoio no tratamento dos dados. Os dados gerados pelo contínuo sequenciamento podem ajudar a suportar as informações de anotação e análise de genes biossintéticos em plantas nativas e de interesse da comunidade de produtos naturais, além de criar oportunidades para o florescimento de soluções criativas e de maior impacto na área.

### Engenharia metabólica

A complexidade e diversidade estrutural dos metabólitos secundários produzidos por bactérias, fungos, plantas e outros organismos confere a estes compostos inúmeras distinções quando comparados às coleções de moléculas geradas por síntese combinatória. Ao mesmo tempo, a síntese química como estratégia única para obtenção destes alvos em escala que viabilize estudos de atividades farmacológicas é inviável e, pela mesma razão, a obtenção de análogos estruturais é bastante restrita. Neste sentido, a engenharia metabólica se apresenta como uma importante alternativa para aumentar de forma significativa a produção de metabólitos secundários.

A possibilidade de promover a reconstrução *in vitro* possibilitou a caracterização de etapas individuais, a identificação de intermediários



**Figura 2.** Produtos naturais com atividade antitumoral cujas descobertas foram direcionadas por metagenômica

biossintéticos, além de permitir um melhor entendimento de como as etapas metabólicas podem ser manipuladas para a produção de análogos estruturais. Por meio da manipulação *in vitro* é possível alcançar um nível de diversificação inalcançável naturalmente.<sup>33</sup>

A engenharia metabólica acopla as previsões originadas por *genome mining* e manipulação *in vitro*. Deste princípio evoluíram os conceitos de biossíntese combinatória e mutassíntese moderna.

A biossíntese combinatória, em geral, toma proveito da versatilidade do maquinário das enzimas modulares. Os genes que codificam para os complexos multienzimáticos que atuam neste arranjo colinear permitem a evolução destes sistemas. A alteração, troca e deleção de módulos e domínios individuais das PKSs e NRPSs permitem a obtenção de moléculas modificadas, possibilitando ampliar o grupo de metabólitos gerados através de um maquinário por redefinição das vias biossintéticas.<sup>35</sup> Até o momento, a biossíntese combinatória de produtos naturais permitiu: a variação do estado redox de blocos de construção existentes através de deleção ou inativação de domínios enzimáticos redox; diversificação das subunidades incorporadas ao longo da biossíntese por experimentos de troca de domínios; aumento da flexibilidade do módulo iniciador; obtenção de fragmentos truncados cíclicos e acíclicos realocando-se o domínio da tioesterase; alteração das enzimas pós-modificadoras.<sup>36</sup> A diversidade estrutural possível de ser gerada, em princípio, é limitada por quão longe se pode ir para relaxar a especificidade dos domínios enzimáticos individuais.

A mutassíntese é uma metodologia que combina a síntese química e a engenharia metabólica.<sup>37</sup> O conceito é análogo ao da biossíntese dirigida pelo precursor, no entanto, neste caso o micro-organismo é geneticamente modificado a partir da inativação de um gene impedindo a incorporação de um substrato específico pela enzima. A biossíntese pode ser restaurada a partir da adição de análogos estruturais, *mutassintons*, ao meio de cultivo originando a diversidade molecular. Como a competição endógena é minimizada, o rendimento do processo pode ser ampliado.

A mutassíntese foi essencialmente demonstrada há mais de 40 anos,<sup>38</sup> entretanto o aumento na disponibilidade de intermediários sintéticos e das informações relacionadas às seqüências de genes para

facilitar análises *in silico* convergiram para retomar as expectativas de aplicação da mutassíntese como metodologia para ampliar diversidade molecular. Análogos da rapamicina,<sup>39</sup> borrelidina,<sup>40</sup> FK-506 e FK520,<sup>41</sup> ansamitocina e geldanamicina,<sup>42</sup> entre outros, são exemplos de moléculas cujas aproximações mutassintéticas permitiram a obtenção de análogos.

Em geral a engenharia de etapas metabólicas também pode ser utilizada para ampliar a produção de um metabólito por mutagênese randômica e triagem; alterando-se a distribuição do fluxo metabólico pela adição de precursores biossintéticos, pela manipulação racional de sistemas regulatórios específicos que governam a produção de metabólitos secundários ou ainda utilizando-se expressão heteróloga.<sup>43</sup>

Os exemplos apresentados servem para mostrar que manipulação genética de micro-organismos, associada com os avanços na área de biologia sintética tem-se apresentado como uma ferramenta altamente vantajosa, uma vez que a síntese química (ou etapas dela) de fármacos e outros insumos químicos por diversas rotas podem ser substituídas pela fermentação de um micro-organismo. Um grande avanço em termos de qualidade científica e inovação para a obtenção de novos produtos naturais e produtos naturais modificados poderá ser alcançado quando pesquisas em biossíntese, biologia molecular, bioinformática e síntese química estiverem atuando de maneira integrada.<sup>44</sup>

É importante também mencionar que as estratégias de *mining* permitem não somente que genes e vias biossintéticas sejam elucidados, mas também revela inúmeras enzimas envolvidas em reações bioquímicas não usuais que podem vir a gerar aplicações biotecnológicas adicionais.

## Ecologia Química

Historicamente, a química de produtos naturais tem sido impulsionada e direcionada para a descoberta de compostos úteis para o homem, com aplicação como fármacos, agroquímicos, corantes, fragrâncias, aromatizantes, etc. Por outro lado, os esforços da comunidade científica para tentar descrever a real função dos produtos naturais para seus organismos produtores são menos expressivos.<sup>45</sup>



Os organismos estão constantemente interagindo entre si em um ecossistema; estabelecendo relações com indivíduos da mesma espécie (intraespecíficas) ou de diferentes espécies (interespecíficas). Os produtos naturais podem desempenhar diversos papéis vitais nas relações intraespecíficas, como agentes *quorum sensing* (sinalizadores) em bactérias, atraentes de gametas em algas e fungos, feromônios sexuais e de alarme em insetos, etc. Nas relações interespecíficas, sejam simbióticas ou parasitárias, os produtos naturais também podem desempenhar funções vitais, por exemplo na atração de polinizadores e na defesa química contra predadores ou competidores. Em todas estas situações, os produtos naturais atuam como sinais químicos.

No Brasil, as pesquisas na área de Ecologia Química estão mais voltadas à área de feromônios de insetos, para controle de pragas da agricultura. Uma área pouco explorada envolve o estudo de relações simbióticas interespecíficas.

A simbiose em geral é uma relação de longa duração, encontrada com frequência nas comunidades terrestres e aquáticas, com papel fundamental no surgimento das principais formas de vida na Terra na geração de diversidade biológica.<sup>46</sup>

Os micro-organismos surgiram e se diversificaram previamente aos macro-organismos multicelulares. Estes organismos mais complexos constituíram novos *habitats* para os micro-organismos, fontes de nutrientes e proteção, fazendo com que muitos micro-organismos se tornassem dependentes de seus hospedeiros para a sobrevivência. Por outro lado, os compostos bioativos produzidos pelos micro-organismos podem ser usados como agentes de defesa pelos hospedeiros. Como resultado, plantas, animais e humanos têm se envolvido em complexas interações com micro-organismos durante sua evolução.<sup>46,47</sup>

Os produtos naturais podem resultar das interações de organismos entre si e destes com o ambiente, e devem desempenhar funções específicas nestas associações simbióticas, representando uma das vantagens adaptativas e evolutivas para os organismos produtores.<sup>47</sup> Como consequência desta função ecológica, os produtos naturais microbianos representam importantes fontes para a bioprospecção de novos compostos com possível aplicação na medicina (fármacos), agricultura (agroquímicos) e nos estudos de processos biológicos (biologia química).

Recentemente, David J. Newman e Gordon M. Cragg enfatizaram que há um “reconhecimento de que um número significativo de fármacos ou protótipos baseados em produtos naturais são, na verdade, produzidos por micro-organismos ou interações microbianas com ‘hospedeiros dos quais os micro-organismos foram isolados’, e portanto esta área de pesquisa em produtos naturais deve ser expandida significativamente”.<sup>3</sup>

De fato, a pesquisa com micro-organismos que vivem em associações simbióticas com outros organismos como plantas, insetos, organismos marinhos e nematoides, e mesmo em associação com outros micro-organismos, está sendo cada vez mais explorada na química de produtos naturais em diversos países como uma alternativa para a busca de substâncias com atividade biológica.

A maioria dos trabalhos relacionados a micro-organismos simbiotes segue as estratégias tradicionais da química de produtos naturais, envolvendo o isolamento da linhagem microbiana de seu *habitat*, o cultivo em laboratório e a triagem dos extratos obtidos em diferentes ensaios biológicos para o isolamento e identificação dos produtos naturais. Isto permite a identificação de produtos naturais bioativos, foco da bioprospecção, porém não fornece respostas para a difícil questão que envolve as razões pelas quais os produtos naturais são biosintetizados. Trabalhos mais recentes têm sido conduzidos para se determinar a função real destes produtos naturais para o micro-organismo produtor. Exemplos elegantes da determinação da função ecológica de produtos naturais microbianos incluem estudos

realizados com insetos, que abrigam um surpreendente número de micro-organismos simbiotes.

As formigas são um exemplo fascinante de antiga interação simbiótica com micro-organismos. Formigas *Apterostigma dentigerum* coevoluíram em mutualismo com o fungo basidiomiceto *Leucoagaricus* sp., o qual é cultivado em jardins como fonte de alimento. Porém, fungos filamentosos parasitas do gênero *Escovopsis* podem comprometer a viabilidade dos ninhos de formigas, devido ao efeito tóxico frente a *Leucoagaricus* sp. Como forma de proteção, as formigas carregam actinobactérias, principalmente dos gêneros *Pseudonocardia* e *Streptomyces*, em estruturas especializadas em seu corpo. As actinobactérias produzem antimicrobianos que controlam a infecção por *Escovopsis* sp., protegendo a fonte de alimento das formigas. *Pseudonocardia* spp. produz o depsipeptídeo cíclico dentigerumicina (**18**), que inibe o fungo parasita *Escovopsis* sp., além de outros fungos patogênicos, sem toxicidade ao fungo alimento das formigas.<sup>48</sup> Antimicinas A<sub>1</sub>-A<sub>4</sub> (**19-22**), valinomicina (**23**) e actinomicinas D e X<sub>2</sub> (**24-25**) (Figura 3) foram identificadas em espécies de *Streptomyces* em associação com as formigas cortadeiras *Acromyrmex echinator* e possuem atividade antibiótica relacionada com a proteção das formigas contra patógenos.<sup>49</sup> Diversas espécies *Streptomyces* spp., associadas à formiga cortadeira *Acromyrmex octospinosus*, produziram o antibiótico macrolídeo candicinina D (**26**) (Figura 3), que, juntamente com outros antibióticos produzidos por essas actinobactérias, deve auxiliar no combate aos fungos patogênicos que possam causar morte de fungos *Leucoagaricus* sp..<sup>50</sup>

Vespas *Sceliphron caementarium* estão em simbiose com *Streptomyces* sp., que produz o polieno macrocíclico esclifolactama (**27**) (Figura 3), substância com atividade antifúngica frente a *Candida albicans* resistente à anfotericina B.<sup>51</sup> Vespas *Philanthus* spp. cultivam bactérias simbiotes específicas *Streptomyces* spp. que são incorporadas no casulo para proteção contra patógenos. Essas actinobactérias produzem as substâncias antibióticas estreptoclorina (**28**), piericidina A<sub>1</sub> (**29**), piericidina B<sub>1</sub> (**30**), glucopiericidina A (**31**) piericidina A<sub>5</sub> (**32**), piericidina C<sub>1</sub> (**33**), 9'-desmetil-piericidina A<sub>1</sub> (**34**), piericidina B<sub>2</sub> (**35**) e piericidina IT-143-B (**36**) (Figura 3), sugerindo que essa relação favorece a sobrevivência das vespas através da proteção das larvas no casulo contra patógenos.<sup>52</sup>

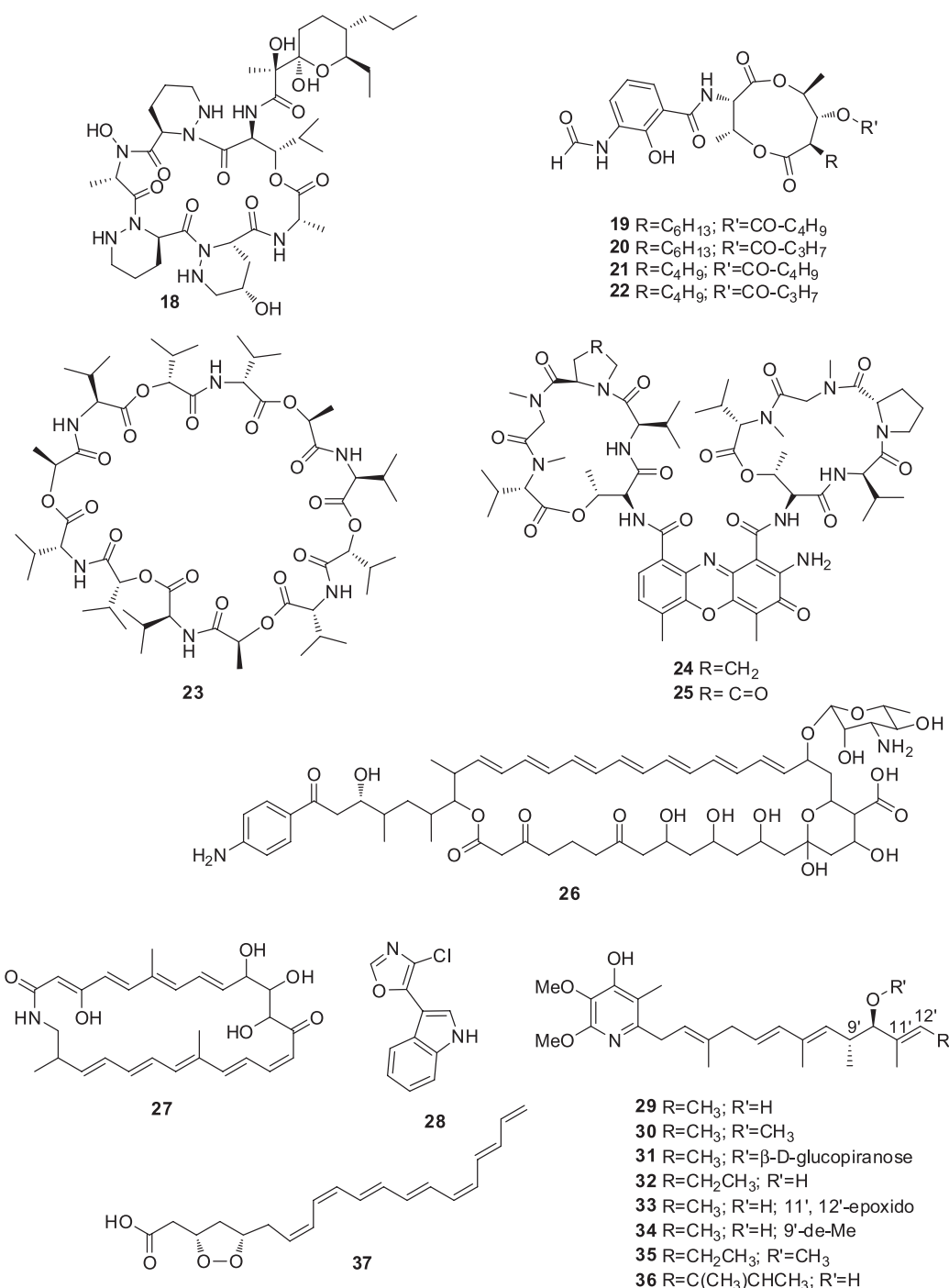
*Streptomyces* sp., simbiote do besouro *Dendroctonus frontalis*, é responsável pela produção da micangimicina (**37**) (Figura 3), que inibe o crescimento do fungo *Ophiostoma minus*, competidor natural do fungo *Entomocorticium* sp. Este último fungo possui importante função protetora durante o desenvolvimento de larvas do besouro *Dendroctonus frontalis*.<sup>53,54</sup>

Estes, entre outros exemplos, mostram que o estudo dos micro-organismos associados a outros organismos pode auxiliar na compreensão da função dos produtos naturais microbianos na manutenção da relação simbiótica.

Porém, os maiores desafios da Ecologia Química envolvem, além da elucidação das estruturas químicas dos produtos naturais envolvidos na mediação de relações intra e interespecíficas, a compreensão da intrigante questão de como as mensagens transmitidas estão relacionadas às estruturas químicas destes metabólitos,<sup>45</sup> isto é, a relação entre estrutura química e função biológica.

Reconhecido pesquisador na área de Ecologia Química, Jerrold Meinwald considera que “O impacto da pesquisa em produtos naturais no entendimento da química, ecologia e evolução, assim como na prática da medicina, agricultura e ciências ambientais, não podem ser subestimados. Neste contexto, a elucidação da química da Natureza, realizada principalmente em conjunção com o estudo de sistemas receptores e transdutores, constituem um dos grandes desafios intelectuais da humanidade”.<sup>45</sup>

O entendimento da função dos produtos naturais em seus



**Figura 3.** Produtos naturais microbianos envolvidos na simbiose de formigas com actinobactérias (18-26) e na simbiose de actinobactérias com vespas (27-36) e com besouro (37)

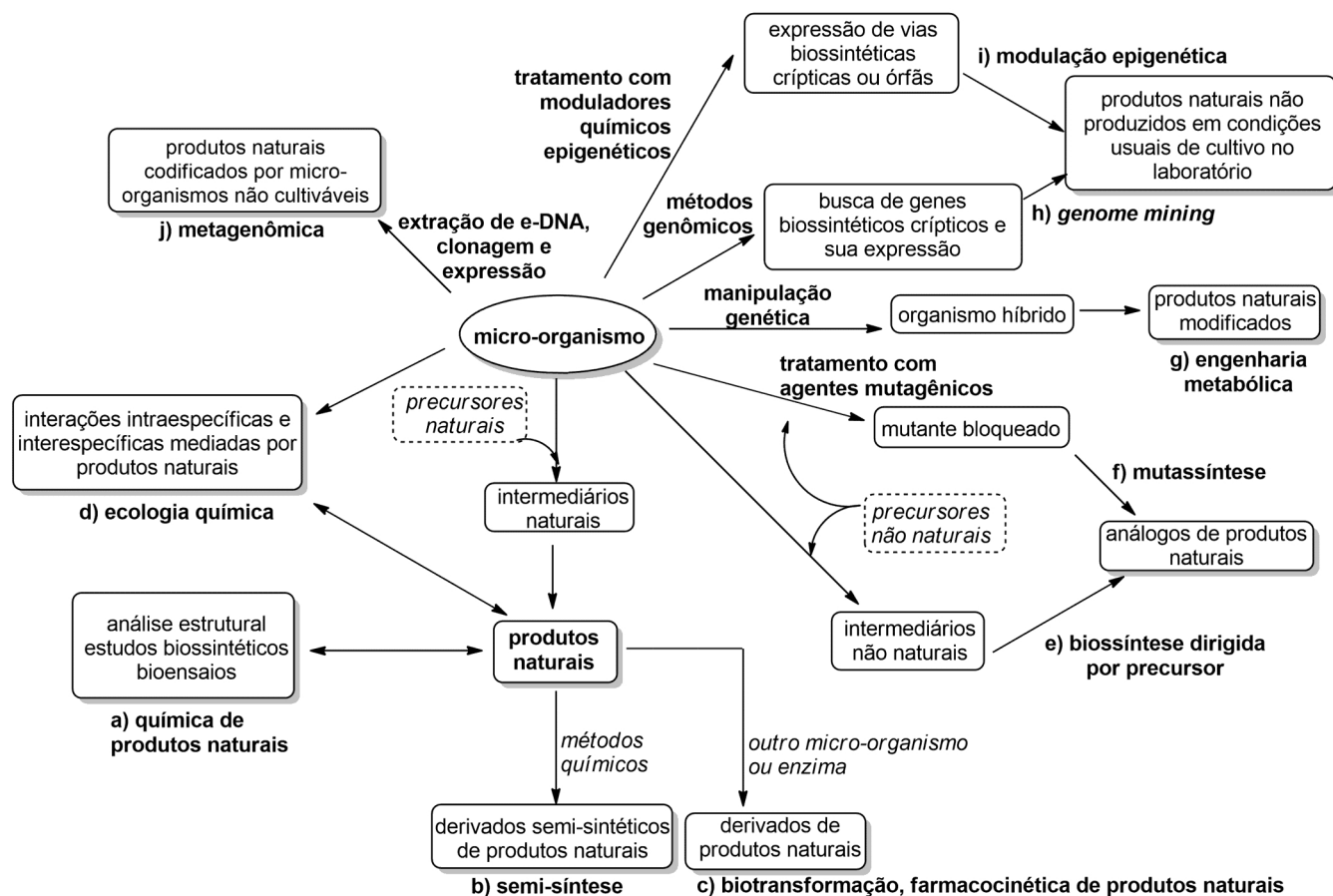
ecossistemas é, portanto, essencial para preservação da biodiversidade e pode, ainda, contribuir com inovação através da descoberta de substâncias com aplicações terapêuticas e agroquímicas, possibilitando o almejado desenvolvimento sustentável do Brasil.

A Figura 4 sumariza algumas das abordagens mais modernas discutidas neste texto para o acesso a produtos naturais microbianos, além das tradicionais que continuam dando sustentação a esta área.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

No Brasil, pesquisas em *genome* e *metagenome mining* são incipientes e ainda dificultadas pelos altos custos de sequenciamento.

A montagem de algumas *facilities* de sequenciamento tem sido apoiada por algumas universidades e agências de fomento, o que pode viabilizar o sequenciamento de um maior número de linhagens, entretanto a formação específica em Bioinformática ainda é bastante carente. Faltam também recursos humanos capacitados para atuar nas áreas mencionadas, o que pode vir a ser minimizado com as políticas de incentivo às áreas de fronteira do conhecimento. Os cursos de formação em nível superior possuem currículos muito engessados e com pouco dinamismo para acompanhar algumas das tendências mundiais. Por outro lado, a Pós-Graduação aparentemente ainda não encontrou uma forma de valorizar as áreas que atuam na interface do conhecimento.



**Figura 4.** Principais estratégias de trabalho com micro-organismos para o acesso a produtos naturais e seus derivados e análogos, envolvendo as abordagens mais tradicionais (a-c) e as abordagens mais modernas (d-j), que permitem o acesso à diversidade estrutural e entendimento da função dos metabólitos secundários para o organismo produtor

A pesquisa no Brasil é realizada majoritariamente nas universidades e por pós-graduandos que almejam os seus títulos de mestrado e/ou doutorado. Esta situação cria uma série de dificuldades, pois esses alunos querem, em geral, em função da demanda, ter formação especializada em uma determinada disciplina. Assim, egressos de programas de pós-graduação podem ter dificuldades em conseguir fixação na carreira acadêmica se não tiverem a formação em uma determinada área, ou seja, químicos requerendo químicos de formação. A organização departamental que ainda persiste nas universidades dificulta sobremaneira a contratação de pessoal formado em áreas de interface. Esta situação já foi lembrada em 2003 no documento gerado pela SBQ e conhecido como eixos mobilizadores da química.<sup>55</sup> Todavia os problemas parecem persistir ainda nos vários concursos para ingresso na carreira universitária.

Ainda os cursos de pós-graduação são também organizados em temas muito específicos não prestigiando conhecimento interdisciplinar, criando a expectativa de que os projetos onde se adicionam conhecimento ao que já existe são garantidos como bem sucedidos, o que por sua vez somente gera inovação incremental, onde o risco basicamente inexistente. Atuando desta forma as chances de descobertas de impacto certamente serão mínimas. Por outro lado não há expectativa de desenvolvimento de projetos de risco e de interfaces onde as chances de descoberta de grande impacto seriam majoradas substancialmente. Os incentivos na forma de chamadas específicas que facilitem o financiamento e a aproximação de diversos especialistas também podem promover o avanço esperado para essas áreas de pesquisa.

Não se pode afirmar que a CAPES, que é a grande agência organizadora da pós-graduação no país, esteja alheia ao problema

da formação inter e multidisciplinar, pois há vários programas de pós-graduação, incluindo biotecnologia, que se enquadram na área multidisciplinar. O que não se sabe exatamente é o quão multidisciplinares esses programas são efetivamente. Um programa de pós-graduação em biologia química está em funcionamento na UNIFESP - Campus Diadema, Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas.

Uma grande mudança tem sido experimentada pela área de produtos naturais microbianos no exterior, através da inserção das ferramentas moleculares no entendimento e manipulação de vias biossintéticas, tanto na academia quanto em empresas de biotecnologia, como recentemente enfatizado em artigo publicado na revista *Chemical & Engineering News*.<sup>56</sup> A biodiversidade brasileira oferece inúmeras possibilidades para o desenvolvimento de pesquisas que propiciem, simultaneamente, sua preservação, com base em seu conhecimento mais detalhado, e inovação, por meio da descoberta de substâncias com potencial aplicação nas indústrias química e farmacêutica. O país experimenta um momento favorável ao desenvolvimento de projetos mais ousados e inovadores. São muitas as possibilidades para estudantes de graduação e pós-graduação estudarem e desenvolverem parte de suas pesquisas em centros de excelência no exterior e, assim, incorporarem estratégias modernas de trabalho em suas pesquisas, o que certamente poderá ter reflexos muito positivos no futuro da nação.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores expressam seus agradecimentos à FAPESP, ao CNPq



e, em especial, à CAPES por manter o Portal de Periódicos, sem o qual muitas das ideias aqui discutidas não seriam possíveis.

## REFERÊNCIAS

- Pinto, A. C.; Zucco, C.; Galembeck, F.; de Andrade, J. B.; Vieira, P. C.; *Quim. Nova* **2012**, *35*, 2092.
- Pupo, M. T.; Gallo, M. B. C.; Vieira, P. C.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 1446.
- Newman, D. J.; Cragg, G. M.; *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 311.
- Eng, C. P.; Sehgal, S. N.; Vézina, C.; *J. Antibiot.* **1984**, *37*, 1231; Peralba, J. M.; deGraffenried, L.; Friedrichs, W.; Fulcher, L.; Grünwald, V.; Weiss, G.; Manuel HidalgoPeralba, M.; *Clin. Cancer Res.* **2003**, *9*, 2887; Bianco, R.; Garofalo, S.; Rosa, R.; Damiano, V.; Gelardi, T.; Daniele, G.; Marciano, R.; Ciardiello, F.; Tortora Bianco, G.; *Brit. J. Cancer* **2008**, *98*, 923.
- Gupta, P. B.; Onder, T. T.; Jiang, G.; Tao, K.; Kuperwasser, C.; Weinberg, R. A.; Lander, E. S.; *Cell* **2009**, *138*, 645.
- Bentley, S. D.; Chater, K. F.; Cerdeño-Tarraga, A.-M.; Challis, G. L.; Thomson, N. R.; James, K. D.; Harris, D. E.; Quail, M. A.; Kieser, H.; Harper, D.; Bateman, A.; Brown, S.; Chandra, G.; Chen, C. W.; Collins, M.; Cronin, A.; Fraser, A.; Goble, A.; Hidalgo, J.; Hornsby, T.; Howarth, S.; Huang, C.-H.; Kieser, T.; Lark, L.; Murphy, L.; Oliver, K.; O'Neil, S.; Rabinowitsch, E.; Rajandream, M.-A.; Rutherford, K.; Rutter, S.; Seeger, K.; Saunders, D.; Sharp, S.; Squares, R.; Squares, S.; Taylor, K.; Warren, T.; Wietzorrek, A.; Woodward, T.; Barrell, B. G.; Parkhill, J.; Hopwood, D. A.; *Nature* **2002**, *417*, 141.
- Ikeda, H.; Ishikawa, J.; Hanamoto, A.; Shinose, M.; Kikuchi, H.; Shiba, T.; Sakaki, Y.; Hattori, M.; Omura, S.; *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 526.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, dados acessados em 20/08/2013.
- <http://www.genomesonline.org/cgi-bin/GOLD/index.cgi>, dados acessados em 20/08/2013.
- Blin, K.; Marnix, H.; Medema, M.H.; Kazempour, D.; Fischbach, M. A.; Breitling, R.; Takano, E.; Weber, T.; *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, W204; Medema, M. H.; Blin, K.; Cimermancic, P.; de Jager, V.; Zakrzewski, P.; Fischbach, M.A.; Weber, T.; Breitling, R.; Takano, E.; *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, W339.
- Marc Röttig, M.; Medema, M. H.; Blin, K.; Weber, T.; Rausch, C.; Kohlbacher, O.; *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39* (suppl 2), W362.
- <http://www.nii.ac.in/~pkssdb/sbpsks/master.html>, dados acessados em 20/08/2013.
- Li, M. H. T.; Ung, P. M. U.; Zajkowski, J.; Garneau-Tsodikova, S.; Sherman, D. H.; *BMC Bioinformatics* **2009**, *10*, 185.
- Omura, S.; Ikeda, H.; Ishikawa, J.; Hanamoto, A.; Takahashi, C.; Shinose, M.; Takahashi, Y.; Horikawa, H.; Nakazawa, H.; Osonoe, T.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*, 12215; Paulsen, I. T.; Press, C. M.; Ravel, J.; Kobayashi, D. Y.; Myers, G. S.; Mavrodi, D. V.; DeBoy, R. T.; Seshadri, R.; Ren, Q.; Madupu, R.; *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 873; Bok, J. W.; Hoffmeister, D.; Maggio-Hall, L. A.; Renato, M.; Glasner, J. D.; Keller, N. P.; *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 31; Fazio, G. C.; Xu, R.; Matsuda, S. P. T.; *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5678.
- Lautru, S.; Deeth, R. J.; Bailey, L. M.; Challis, G. L. *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 265; Challis, G. L.; Ravel, J.; *FEMS Microbiol. Lett.* **2000**, *187*, 111; Tohyama, S.; Eguchi, T.; Dhakal, R. P.; Akashi, T.; Otsuka, M.; Kakinuma, K.; *Tetrahedron* **2004**, *60*, 3999; McAlpine, J. B.; Bachmann, B. O.; Pirae, M.; Tremblay, S.; Alarco, A. -M.; Zazopoulos, E.; Farnet, C. M.; *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 493; Banskota, A. H.; McAlpine, J. B.; Sorensen, D.; Aouidate, M.; Pirae, M.; Alarco, A. -M.; Omura, S.; Shiomi, K.; Farnet, C. M.; Zazopoulos, E.; *J. Antibiot.* **2006**, *59*, 168; Banskota, A. H.; McAlpine, J. B.; Sorensen, D.; Ibrahim, A.; Aouidate, M.; Pirae, M.; Alarco, A. -M.; Farnet, C. M.; Zazopoulos, E.; *J. Antibiot.* **2006**, *59*, 533; Xiong, Q.; Wilson, W. K.; Matsuda, S. P. T.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1285; Lin, X.; Hopson, R.; Cane, D. E.; *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6022; Scherlach, K.; Hertweck, C.; *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 3517; Fischbach, M. A.; Walsh, C. T.; *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3468; Wenzel, S. C.; Meiser, P.; Binz, T. M.; Mahmud, T.; Muller, R.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2296; Song, L.; Barona-Gomez, F.; Corre, C.; Xiang, L.; Udvary, D. W.; Austin, M. B.; Noel, J. P.; Moore, B. S.; Challis, G. L.; *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14754; Gross, H.; Stockwell, V. O.; Henkels, M. D.; Nowak-Thompson, B.; Loper, J. E.; Gerwick, W. H.; *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 53; Bergmann, S.; Schumann, J.; Scherlach, K.; Lange, C.; Brakhage, A. A.; Hertweck, C.; *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 213.
- Udvary, D. W.; Zeigler, L.; Asolkar, R. N.; Singan, V.; Lapidus, A.; Fenical, W.; Jensen, P. R.; Moore, B. S.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 10376.
- Kanchanabancha, C.; Tao, W.; Hong, H.; Liu, Y.; Hahn, F.; Samborsky, M.; Deng, Z.; Sun, Y.; Leadlay, P. F.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 5785.
- Bergmann, S.; Schumann, J.; Scherlach, K.; Lange, C.; Brakhage, A. A.; Hertweck, C.; *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 213.
- Cobb, R. E.; Zhao, H. *Nat. Biotechnol.* **2012**, *30*, 405.
- Gomez-Escribano, J. P.; Bibb, M. J.; *Methods Enzymol.* **2012**, *517*, 279; Komatsu, M.; Komatsu, K.; Koiwai, H.; Kosone, I.; Izumikawa, M.; Hashimoto, J.; Takagi, M.; Shinya, K.; Cane, D. E.; Ikeda, H.; *ACS Synth. Biol.* **2013**, *2*, 384.
- Xu, W.; Cai, X. L.; Jung, M. E.; Tang, Y.; *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 13604; Gao, X.; Haynes, S. W.; Ames, B. D.; Wang, P.; Vien, L. P.; Walsh, C. T.; Tang, Y.; *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *10*, 823.
- Wang, Y.; Chen, Y.; Shen, Q.; Yin, X.; *Gene* **2011**, *483*, 11.
- Li, B.; Walsh, C. T.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 19731.
- Huang, T.; Wang, Y.; Yin, J.; Du, Y.; Tao, M.; Xu, J.; Chen, W.; Lin, S.; Deng, Z.; *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 20648.
- Rateb, M. E.; Houssen, W. E.; Arnold, M.; Abdelrahman, M. H.; Deng, H.; Harrison, W. T.; Okoro, C. K.; Asenjo, J. A.; Andrews, B. A.; Ferguson, G.; Bull, A. T.; Goodfellow, M.; Ebel, R.; Jaspars, M.; *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 1491.
- Chiang, Y. M.; Szweczyk, E.; Nayak, T.; Davidson, A. D.; Sanchez, J. F.; Lo, H. C.; Ho, W. Y.; Simityan, H.; Kuo, E.; Praseuth, A.; Watanabe, K.; Oakley, B. R.; Wang, C. C.; *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 527.
- Yin, W. B.; Grundmann, A.; Cheng, J.; Li, S. M.; *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 100.
- Nikolouli, K.; Mossialos, D.; *Biotechnol. Lett.* **2012**, *34*, 1393; Tsunematsu, Y.; Ishiuchi, K.; Hotta, K.; Watanabe, K.; *Nat. Prod. Rep.* **2013**, *30*, 1139.
- Cane, D. E.; Ikeda, H.; *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 463; Hu, Y.; Chou, W. K. W.; Hopson, R.; Cane, D. E.; *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 32; Lin, X.; Hopson, R.; Cane, D. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6022.
- Ekkers, D. M.; Cretoiu, M. S.; Kielak, A. M.; Elsas, J. D.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *93*, 1005.
- Piel, J.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 14002; Piel, J.; Butzke, D.; Fusetani, N.; Hui, D.; Platzer, M.; Wen, G.; Matsunaga, S.; *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 472.
- Grindberg, R. V.; Ishoey, T.; Brinza, D.; Esquenazi, E.; Coates, R. C.; Liu, W. T.; Gerwick, L.; Dorrestein, P. C.; Pevzner, P.; Lasken, R.; Gerwick, W. H.; *PLoS ONE* **2011**, *6*, e18565.
- Owen, J. G.; Reddy, B. V. B.; Ternei, M. A.; Charlop-Powers, Z.; Calle, P. Y.; Kim, J. H.; Brady, S. F.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2013**, *110*, 11797; Hentschel, U.; Piel, J.; Degnan, S. M.; Taylor, M. W.; *Nat. Rev. Microbiol.* **2012**, *10*, 641;
- Freeman, M. F.; Gurgui, C.; Helf, M. J.; Morinaka, B. I.; Uria, A. R.; Oldham, N. J.; Sahl, H.-G.; Matsunaga, S.; Piel, J.; *Science* **2012**, *338*, 387.
- Kwon, S. J.; Mora-Pale, M.; Moo-Yeal Lee, M.-Y.; Dordick, J. S.; *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2012**, *16*, 186; Wong, F. T.; Khosla, C.; *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2012**, *16*, 117; Hertweck, C.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4688; Sattely, E. S.; Fischbach, M. A.; Walsh, C. T.; *Nat. Prod. Rep.*

- 2008, 25, 757; Kennedy, J.; *Nat. Prod. Rep.* **2008**, 25, 25; Khosla, C.; Zawada, R. J. X.; *Trends Biotechnol.* **1996**, 14, 335; Walsh, C.; *Science* **2004**, 303, 1805.
36. Tsoi, C. J.; Khosla, C.; *Chem. Biol.* **2005**, 2, 355.
37. Olano, C.; Mendez, C.; Salas, J. A.; *Nat. Prod. Rep.* **2010**, 27, 571.
38. Weissman, K. J.; *Trends Biotechnol.* **2007**, 25, 139.
39. Birch, A. J.; *Pure Appl. Chem.* **1963**, 7, 527; Rinehart, K. L. *Pure Appl. Chem.* **1997**, 49, 141; Shier, W. T.; Rinehart Jr., K. L.; Gottlieb, D.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1969**, 63, 198.
40. Gregory, M. A.; Petkovic, H.; Lill, R. E.; Moss, S. J.; Wilkinson, B.; Gaisser, S.; Leadlay, P. F.; Sheridan, R. M.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 4757.
41. Moss, S. J.; Carletti, I.; Olano, C.; Sheridan, R. M.; Ward, M.; Math, V.; Nur-E-Alam, M.; Brana, A. F.; Zhang, M. Q.; Leadlay, P. F.; Mendez, C.; Salas, J. A.; Wilkinson, B.; *Chem. Commun.* **2006**, 2341.
42. Moss, S. J.; Stanley-Smith, A. E.; Schell, U.; Coates, N. J.; Foster, T. A.; Gaisser, S.; Gregory, M. A.; Martin, C. J.; Nur-e-Alam, M.; Pirae, M.; Radzom, M.; Suthar, D.; Thexton, D. G.; Warneck, T. D.; Zhang, M-Q.; Wilkinson, B.; *Med. Chem. Commun.* **2013**, 4, 324.
43. Eichner, S.; Knobloch, T.; Floss, H. G.; Fohrer, J.; Harmrolfs, K.; Hermans, J.; Schulz, A.; Sasse, F.; Spiteller, P.; Taft, F.; Kirschning, A.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 752.
44. Olano, C.; Lombó, F.; Méndez, C.; Salas, J. A.; *Metab. Eng.* **2008**, 10, 281.
45. Meinwald, J.; *J. Nat. Prod.* **2011**, 74, 305.
46. Moran, N. A.; *Curr. Biol.* **2006**, 16, R866.
47. Conti, R.; Guimarães, D. O.; Pupo, M. T.; *Cienc. Cult.* **2012**, 64, 43.
48. Oh, D.-C.; Poulsen, M.; Currie, C. R.; Clardy, J.; *Nat. Chem. Biol.* **2009**, 5, 391.
49. Schoenian, I.; Spieteller, M.; Ghaste, M.; Wirth, R.; Herz, H.; Spiteller, D.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, 108, 1955.
50. Haeder, S.; Wirth, R.; Herz, H.; Spiteller, D.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, 106, 4742.
51. Oh, D.-C.; Poulsen, M.; Currie, C. R.; Clardy, J.; *Org. Lett.* **2011**, 13, 752.
52. Kroiss, J.; Kaltenpoth, M.; Schneider, B.; Schwinger, M.-G.; Hertweck, C.; Maddula, R. K.; Strhm, E.; Svatos, A.; *Nat. Chem. Biol.* **2010**, 6, 261.
53. Scott, J.; Oh, D.-C.; Yuceer, M. C.; Klepzig, K. D.; Clardy, J.; *Science* **2008**, 322, 63.
54. Oh, D.-C.; Scott, J. J.; Currie, C. R.; Clardy, J.; *Org. Lett.* **2009**, 11, 633.
55. de Andrade, J. B.; Cadore, S.; Vieira, P. C.; Zucco, C.; Pinto, A. C.; *Quim. Nova* **2003**, 26, 445.
56. Jarvis, L. M.; *Chem. Eng. News* **2013**, 91(35), 17.