



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

JOSÉ YURI GOMES DA SILVA

**PROSPECÇÃO *IN SILICO* DE MOLÉCULAS IDENTIFICADAS EM EXTRATOS
CITOTÓXICOS CONTRA CÉLULAS TUMORAIS DE BACTÉRIAS MARINHAS DA
AMAZÔNIA AZUL**

FORTALEZA - CE

2022

JOSÉ YURI GOMES DA SILVA

**PROSPECÇÃO *IN SILICO* DE MOLÉCULAS IDENTIFICADAS EM EXTRATOS
CITOTÓXICOS CONTRA CÉLULAS TUMORAIS DE BACTÉRIAS MARINHAS DA
AMAZÔNIA AZUL**

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Ceará como requisito à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas. Área de concentração: Bioinformática.

Orientador: Prof. Dr. Diego Veras Wilke
Coorientadora: Ma. Thaís Lima de Brito

FORTALEZA - CE

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S58p Silva, José Yuri Gomes da.

Prospecção in silico de moléculas identificadas em extratos citotóxicos contra células tumorais de bactérias marinhas da Amazônia Azul / José Yuri Gomes da Silva. – 2022.
84 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2022.

Orientação: Prof. Dr. Diego Veras Wilke.

Coorientação: Profa. Ma. Thaís Lima de Brito.

1. Produtos naturais marinhos. 2. Bactérias marinhas. 3. Bioinformática. 4. Bioprospecção in silico. 5. Citotoxicidade. I. Título.

CDD 570

JOSÉ YURI GOMES DA SILVA

PROSPECÇÃO *IN SILICO* DE MOLÉCULAS IDENTIFICADAS EM EXTRATOS
CITOTÓXICOS CONTRA CÉLULAS TUMORAIS DE BACTÉRIAS MARINHAS DA
AMAZÔNIA AZUL

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Ceará como requisito à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas. Área de concentração: Bioinformática.
Orientador: Prof. Dr. Diego Veras Wilke
Coorientadora: Ma. Thais Lima de Brito

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Diego Veras Wilke (Orientador)
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Otilia Deusdênia Loiola Pessoa
Universidade Federal do Ceará

Dr. Pedro Filho Noronha de Souza
Universidade Federal do Ceará

A Deus.

Aos meus pais, Cleide e João.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, sem os quais não teria conseguido passar dois dias nesta cidade grande que é Fortaleza. Sem os quais talvez nem tivesse conseguido realizar o sonho de ingressar na Universidade Federal do Ceará. Sem os quais nunca teria descoberto o que é amor de verdade. Passei boa parte da minha infância chorando escondido por ter sido doado pelos meus progenitores, hoje não consigo imaginar o quão melhor estou por ter conseguido uma família de verdade. É tudo por vocês e para vocês, para sempre.

Aos meus irmãos adotivos, em especial à irmãe, Ivoneide. Obrigado por mesmo tão nova, cuidar de mim com todo o amor do mundo. Ao Cássio e ao Júnior, obrigado por existirem. À Ivoneide, que não pôde me assistir em matéria, mas que sei que cuida de nós de outro plano: Obrigado pelas cartas psicografadas, por me inspirar a realizar o teu sonho de fazer biologia. Ao Micássio, do qual mal consigo lembrar, e à Ana Cleide, que nunca conheci: Obrigado por fazerem parte da minha família. À Rayanne, minha irmã biológica, por todo o carinho. Ao Riu, por tudo. Aos cachorros Mel e ao Thomas, por alegrarem meus dias em Beberibe. À Abelhinha, que não pude ver crescer, mas sempre amarei.

Às minhas sobrinhas, Lara e Tainá, por alegrarem os dias quando estou no interior. Obrigado por confiarem a mim as atividades de casa, as fofocas da escola, a infância e pré-adolescência de vocês. Tudo é por vocês também, sempre.

Ao meu namorado, Iago, obrigado por estar presente nos momentos bons e ruins. Obrigado por ser meu parceiro em discussões sobre todos os temas possíveis, pelos filmes assistidos no cinema e em casa, pelos carinhos e pela paciência. Amo você. Obrigado também pela segunda família que eu ganhei. À Lara, por não me odiar no quarto de vocês por semanas seguidas, pelos memes compartilhados, pelos planos de gastar dinheiro de todas as maneiras possíveis. À Kátia, por me acolher como genro - esta palavra ainda soa estranha, um dia eu acostumo, - por cuidar de mim aqui em Fortaleza, por confiar em mim para cuidar das coisas quando você está ausente. À dona Neném, minha “vó torta”, por me aceitar na sua casa, pelas conversas, pelas histórias da juventude e piadas sem graça. Ao João, pelo carinho e pelas conversas, é muito bom falar dos outros com você. Ao Zé Filho, à Inês, ao Edivaldo. À Luci. Ao Dallas, meu filho felino; ao Austin, onde quer que você esteja, saudades; à Megg, ao Max. Aos outros milhões de gatos daí, muito obrigado.

Aos meus amigos da graduação. Eu não teria conseguido sem o apoio de vocês. Ao Daniel, por ser meu companheiro em todos os momentos, mesmo nos que eu falhei como amigo. Ao Gabriel, por compartilhar momentos de cantoria nos ônibus para a Parangaba. Ao Wilker, por ter sido meu companheiro de todos os rolês. À Sara, por ser a pessoa mais fofa e gentil que eu conheci, obrigado pelos trabalhos na tua casa, pelas pizzas compartilhadas entre nós e os meninos que eu já citei.

Obrigada à Yvana, por dividir tantos momentos, bons e ruins. A Laninha tem uma mãe incrível. Às Brunas, a Nunes e a Gomes, por alegrarem meus dias com as melhores conversas. Ao Davi, à Mariana, ao Ramon, ao Lucas Vinícius, à Joyce, ao Giovani. A todos os meus colegas nesse processo difícil e inesquecível. Boa sorte na caminhada de vocês.

Obrigado à Mayra, minha companheira de moradia, de curso, de vida. Obrigado por morar comigo e me aturar por quase três anos. Feliz casamento, muitas realizações pessoais e profissionais. Feliz vida! Ao Isaías, por também dividir apartamento comigo, saudades de fofocar e reclamar da vida com você. Felicidades, amigo!

Aos amigos da escola, dos quais ainda mantenho contatos e afetos. Ao Pedro Eugênio, obrigado por vencer de mim no soletrando da quinta série e por nunca desgrudar de mim depois da sexta. Amo você, amigo. À Viviane e ao Jarlison, o eterno trio 703. Obrigado pelos dias estudando pro ENEM, por todas as conversas e afetos. À Zaine, Isabel e Livinha. Amo vocês três, saudades. Ao Lipe, que mesmo morando longe, sempre se manteve perto de mim. Obrigado a todos.

À Natali, por dividir sonhos e momentos inesquecíveis. Por ser a melhor jornalista que eu conheço. E a melhor escritora, também. Amo você! À Rayanna e à Gis, obrigado por todos os momentos na residência universitária.

Ao professor Diego Wilke, por aceitar orientar um aluno perdido no sexto semestre. Por me inspirar em todas as conversas com o seu entusiasmo pela ciência e pela docência. Obrigado por acreditar que as coisas dão certo, mesmo quando eu sou só desespero. À Thaís, por me adotar como orientando, por ser a pessoa mais paciente e esforçada que eu conheço. A todos os membros do LABBMar, muito obrigado! Mesmo à distância, pude contar com o apoio de todos vocês.

À professora Otília Pessoa por aceitar participar da banca de avaliação, muito obrigado. Agradeço em nome do laboratório por todos os trabalhos em parceria.

Obrigado ao Dr. Francisco das Chagas, o Chaguinha, por ajudar no desenho das moléculas deste trabalho, pela paciência e disponibilidade.

Ao professor Pedro Souza, por aceitar participar da banca avaliadora e por toda ajuda no trabalho. Obrigado por se disponibilizar a tirar minhas dúvidas. Esta monografia não seria possível sem o seu apoio. Muito obrigado!

Obrigado ao BIOLAB, por ter permitido as minhas melhores experiências na graduação. A monitoria mudou minha vida. Obrigado, especialmente ao Rafael e à professora Denise Hissa, por acompanharem e orientarem esse processo. Obrigado a todos os meus colegas monitores. Obrigado à Rivaldina pelas conversas nos plantões de monitoria.

Obrigado à gestão “Juntos com quem vai no mesmo rumo”, do DABio, em 2019. O nome é gigante, e o carinho por vocês também. Obrigado à ENEBio, por me permitir discutir a biologia além da academia, pelos eventos que me ajudaram a crescer como biólogo e como pessoa.

Agradeço também a todos que permitiram que eu chegasse até aqui. Ao sistema de cotas e programas de permanência universitária. À Pró Reitoria de Assuntos Estudantis (PRAE), por permitir que eu me mantivesse aqui em Fortaleza, num curso de tempo integral: Obrigado pelos programas de auxílio moradia e residência universitária.

A todos os professores, do ensino básico e da graduação, que me ajudaram na construção do conhecimento. Obrigado por não desistirem da docência, mesmo diante de tantas dificuldades. Vocês são heróis!

Por fim, obrigado a Deus por permitir que todas as coisas, boas e ruins, acontecessem. Obrigado por me permitir agradecer a tanta gente.

Obrigado a quem leu esta seção de agradecimentos gigantesca. Não consegui ser sucinto. Nunca consigo. Perdão e, só mais uma vez, obrigado!

“Afim de contas, o que nos trouxe até aqui, medo ou coragem? Talvez nenhum dos dois.” (Engenheiros do Hawaii).

RESUMO

Doenças complexas como o câncer estão entre as principais causas de morte ao redor do mundo. Por possuírem diversas vias envolvidas em sua patogênese, essas enfermidades podem responder melhor a moléculas que agem em mais de um alvo terapêutico. Nessa perspectiva, os produtos naturais (PNs) são uma importante fonte de moléculas, pois possuem uma natureza *multi-target* que pode ser útil no tratamento de diversas doenças. O processo clássico de descobrimento e desenvolvimento de novos medicamentos, porém, é caro e demorado, podendo levar décadas desde a identificação do composto ativo até sua aprovação por agências regulatórias. Abordagens *in silico* podem contribuir para a investigação de compostos bioativos, permitindo a identificação de vários possíveis alvos de maneira concomitante. O MicroMarin é um banco de microrganismos que possui aproximadamente 1.400 cepas de bactérias marinhas de vida livre obtidas a partir de sedimentos ou associadas a invertebrados coletados na Amazônia Azul. Aproximadamente, 15% dos extratos orgânicos de culturas de bactérias do MicroMarin testados apresentaram atividade citotóxica contra células tumorais. Este trabalho objetivou realizar o levantamento, catalogação e a investigação, por meio de *target fishing*, de possíveis alvos moleculares para PNs de origem marinha pertencentes ao MicroMarin. Foram identificadas 97 moléculas, de pelo menos 17 classes químicas, relativas a 30 cepas de bactérias. Três plataformas foram utilizadas para a identificação de alvos proteicos através de *target fishing*: TargetNet, MolTarPred e PassOnline, e permitiram a identificação de um total de 2662 alvos. Dentre o extenso número de alvos possíveis, foram identificadas, posteriormente, aquelas moléculas que interagiram com alvos em mais de um banco de dados com probabilidade de interação >90. As dicetopiperazinas Ciclo (Trp-*trans*-Pro) e Ciclo (Trp-*cis*-Pro) interagiram com o receptor opióide do tipo kappa, enquanto as moléculas estaurosporina, hidróxi-estaurosporina, N-metil-estaurosporina, N-metil-hidróxi-estaurosporina e N-carboxamida-estaurosporina interagiram com cinco proteínas do tipo quinase. A investigação das moléculas identificadas no MicroMarin permitiu a atualização do banco de microrganismos, a caracterização das cepas presentes e dos trabalhos realizados com as bactérias. A prospecção do potencial farmacológico das moléculas dos extratos citotóxicos agregou maior potencial biotecnológico ao banco. Estudos posteriores para avaliar a

interação alvo-ligante, bem como a relevância biológica da mesma precisam ser conduzidos para confirmar os resultados aqui obtidos.

Palavras-chave: Produtos naturais marinhos; bactérias marinhas; bioinformática; bioprospecção *in silico*; citotoxicidade; potencial anticâncer.

ABSTRACT

Complex diseases, such as cancer, are among the leading causes of death around the world. As they have several pathways involved in their pathogenesis, these diseases could respond well to molecules which bind to more than one therapeutic target. From this perspective, natural products (NPs) are an important source of molecules, because these molecules usually have a multi-target nature, which is useful as medicine for a variety of diseases. The discover and development of new drugs is expensive and time-consuming and can take decades from the identification of the active compound until its approval by regulatory agencies. Thus, *in silico* approaches can contribute to the investigation of bioactive compounds, allowing the identification of several possible targets concurrently. MicroMarin is a marine bacterial collection with approximately 1,400 strains from the Blue Amazon, the Brazilian Economic Exclusive Zone. Approximately 15% of the organic extracts of bacteria from MicroMarin tested so far showed cytotoxic activity against tumor cells. This work aimed to carry out the survey, cataloging and investigation, through target fishing, molecular targets of NPs of marine origin belonging to MicroMarin. Ninety-seven molecules of at least 17 chemical classes were identified, identified among 30 bacteria strains. The three platforms used for protein targets through target fishing, TargetNet, MolTarPred and PassOnline, allowed the identification of a total of 2662 targets. Among the large number of possible targets, molecules that interacted with targets in more than one database with interaction probability >90 were chosen. Some interesting hits were Cyclo (Trp-trans-Pro) and Cyclo (Trp-cis-Pro) diketopiperazines interacted with the kappa-type opioid receptor. Additionally, staurosporine, hydroxy-staurosporine, N-methyl-staurosporine, N-methyl-hydroxy-staurosporine and N-carboxamide-staurosporine interacted with five kinase-like proteins. This *in silico* prospection of pharmacological potential added greater biotechnological potential to the bank. Further studies to assess the interaction between target and ligand, as well as its biological relevance, need to be conducted to confirm the results obtained here.

Keywords: marine natural products; marine bacteria; bioinformatics; *in silico* bioprospecting; cytotoxicity; anticancer potential.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Tipos de <i>Target fishing</i>	21
Figura 2 - Mapa-múndi representando a Zona Exclusiva Econômica (ZEE) brasileira, sob uma perspectiva de produtos naturais anticâncer de origem marinha	24
Figura 3 - Representação da planilha de levantamento dos trabalhos realizados pelo grupo de pesquisa, as cepas e moléculas identificadas	31
Figura 4 - Prodigininas identificadas pelo grupo de pesquisa	37
Figura 5 - Piericidinas identificadas pelo grupo de pesquisa	38
Figura 6 - Diketopiperazinas identificadas pelo grupo de pesquisa	39
Figura 7 - Cromomicinas identificadas pelo grupo de pesquisa (Parte 1)	40
Figura 8 - Cromomicinas identificadas pelo grupo de pesquisa (Parte 2)	40
Figura 9 - Antraciclínonas identificadas pelo grupo de pesquisa	41
Figura 10 - Estaurosporinas identificadas pelo grupo de pesquisa	41
Figura 11 - Salinicetais identificados pelo grupo de pesquisa	42
Figura 12 - Rifamicinas identificadas pelo grupo de pesquisa	42
Figura 13 - Isatinas identificadas pelo grupo de pesquisa	43
Figura 14 - Naftoquinonas identificadas pelo grupo de pesquisa	43
Figura 15 – Bases nitrogenadas identificadas pelo grupo de pesquisa	44

Figura 16 – Enterocinas e ácidos biliares identificadas pelo grupo de pesquisa	45
Figura 17 – Amidas identificadas pelo grupo de pesquisa (Parte 1)	46
Figura 18 – Amidas identificadas pelo grupo de pesquisa (Parte 2)	47
Figura 19 – Moléculas diversas identificadas pelo grupo	48
Figura 20 - Distribuição das moléculas identificadas por classe química	49
Figura 21 - Número de <i>hits</i> identificados por banco de dados	50
Figura 22 - Classe proteica dos <i>targets</i> identificados na plataforma TargetNet	51
Figura 23 - Marcas registradas adquiridas por células malignas	58
Figura 24 - Distribuição proporcional da previsão de incidência de câncer, exceto de pele não melanoma, para o triênio 2020-2022 por sexo	59
Figura 25 - Estrutura da Plinabulina (NPI-2358)	63
Figura 26 - Estrutura da Estaurosporina	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação das cepas consultadas nos trabalhos do grupo 35

Tabela 2 - Moléculas cujos alvos se repetiam em mais de uma plataforma de *target fishing* 61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DKPs	Dicetopiperazinas
FDA	Food and Drug Administration
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LaBBMar	Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia Marinha (UFC)
LaFarMar	Laboratório de Farmacologia Marinha (USP)
NCI	National Cancer Institute
PNs	Produtos naturais
UFC	Universidade Federal do Ceará
Unifesp	Universidade Federal de São Paulo
USP	Universidade de São Paulo
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	26
3. OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS.....	28
3.1. Objetivo Geral	28
3.2. Objetivos Específicos.....	28
4. CAPÍTULO 1 - LEVANTAMENTO, CATALOGAÇÃO E <i>TARGET FISHING</i> DAS MOLÉCULAS IDENTIFICADAS DAS BACTÉRIAS DO MICROMARIN.	29
4.1. Considerações iniciais	29
4.2. Metodologia.....	29
4.3 Resultados	34
4.3.1. Levantamento Bibliográfico	34
4.3.2. Perfil das bactérias do banco	34
4.3.3. Moléculas identificadas	36
4.3.4. Prospecção de possíveis alvos por <i>target fishing</i>	49
4.4. Discussão.....	51
4.4.1 . Bactérias do MicroMarin.....	51
4.4.2. Moléculas identificadas	54
5. CAPÍTULO 2 - CARACTERIZAÇÃO E DISCUSSÃO DOS <i>TARGETS</i> EM DESTAQUE.....	57
5.1. Introdução	57
5.2. Resultados	60
5.3. Discussão.....	62
6. CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS	71
APÊNDICE A - LEVANTAMENTO DAS MOLÉCULAS IDENTIFICADAS NOS TRABALHOS DO MICROMARIN.....	83

APÊNDICE B - MOLÉCULAS IDENTIFICADAS, CEPAS E CÓDIGOS SMILES	84
APÊNDICE C - <i>TARGET FISHING</i> DAS MOLÉCULAS IDENTIFICADAS NO MICROMARIN	85

1. INTRODUÇÃO

O processo de desenvolvimento de medicamentos, desde a descoberta do composto ativo à aprovação pelas agências reguladoras, pode levar entre 10 e 15 anos, necessitando de um grande investimento de tempo e recursos (FDA, 2019). Em todas as etapas desse processo, candidatos a medicamentos são descartados, principalmente por apresentarem toxicidade e/ou levarem ao desenvolvimento de efeitos adversos, principalmente em fases tardias dos estudos clínicos (GALATI et. al., 2021).

Galati et. al. (2021) discorre em seu trabalho sobre o paradigma que tem guiado a farmacologia moderna, baseado na relação “uma droga, um alvo, uma doença”. Nessa abordagem, considera-se que um fármaco deve modular apenas um alvo, o que se assemelha à visão de que uma doença qualquer seria causada por apenas um produto gênico, que determinaria a presença ou ausência do fenótipo (ANIGHORO; BAJORATH; RASTELLI, 2014).

Apesar desse paradigma voltado à especificidade entre fármaco-alvo, a maioria das moléculas possuem propriedades polifarmacológicas, podendo tanto atuar em diversos alvos, quanto no mesmo alvo de tipos celulares distintos, levando ao desencadeamento de cascatas metabólicas diferentes (KATZUNG, 2017).

Sobre o termo polifarmacologia (do inglês “polypharmacology”), embora em seus primórdios tenha se confundido com o conceito de polifarmácia, possui hoje um significado distinto na literatura. Enquanto o segundo termo está relacionado ao uso concomitante de 4 ou mais medicamentos pelo paciente (WHO, 2017), o primeiro se relaciona a moléculas que podem se ligar a mais de um alvo biológico (JALENCAS; MESTRES, 2012).

Nesse âmbito, definiremos o termo “molécula promíscua”. Anighoro, Bajorath e Rastelli (2014) discute que a promiscuidade de uma molécula está relacionada ao fato de ela se ligar a diferentes alvos, característica chave da polifarmacologia. Entretanto, enquanto um estudo de polifarmacologia considera os múltiplos alvos terapêuticos, a investigação da promiscuidade também aborda a ligação com os não-alvos (*off-targets*¹). No levantamento bibliográfico deste trabalho, foi possível identificar que os termos se misturam em vários artigos, de modo que

¹ Termo utilizado para alvos não terapêuticos, geralmente relacionados aos efeitos adversos.

alguns autores os consideram sinônimos e outros, termos distintos. Sinônimos ou não, as características polifarmacológicas das moléculas biologicamente ativas não são apenas capazes de explicar os efeitos colaterais de um fármaco, como expandem a possibilidade de que um único composto possa modular produtos gênicos ligados a mais de uma doença, ou a mais de uma via de uma doença complexa.

Quando caracterizamos as doenças com maior incidência e impacto socioeconômicos na população mundial, evidenciamos que, excetuando aquelas causadas por mutação ou eliminação de genes específicos, a grande maioria possui uma patogênese multifatorial ou complexa (COSTANTINO; BARLOCCO, 2013). Exemplos de patologias complexas são o câncer, as doenças cardiovasculares e inflamatórias, a obesidade, a ansiedade e a depressão. Dados da Organização Mundial da Saúde apontam que cânceres no trato respiratório causaram a morte de 1.8 milhões de indivíduos e ocuparam a sexta posição entre as causas de morte em 2019 (WHO, 2020).

Doenças complexas constantemente tendem a ser resistentes à perturbação quando um único alvo é modulado, visto que vias alternativas podem ser ativadas, levando ao aparecimento de mecanismos compensatórios (BARBOSA, 2014). Ademais, Barbosa (2014) enfatiza o desenvolvimento de mecanismos de resistência, que ocorrem, em sua maioria, por meio da indução de mutação em genes específicos, do aumento da produção de proteínas alvos e da ativação de vias alternativas de sinalização.

O paradigma “uma droga, um alvo, uma doença” contribuiu para o desenvolvimento de fármacos extremamente específicos nas últimas décadas, além de ter contribuído para a compreensão das interações entre alvo e fármaco. Porém, as constantes falhas na aprovação de medicamentos para o tratamento de doenças complexas parecem indicar que esse método não deve ser o único considerado para investigar a rede de interações entre fármacos, seus múltiplos alvos terapêuticos e seus efeitos adversos (CHAUDHARI et. al., 2017). Portanto, metodologias de investigação de moléculas polifarmacológicas são essenciais no processo de prospecção de novas moléculas com potencial terapêutico.

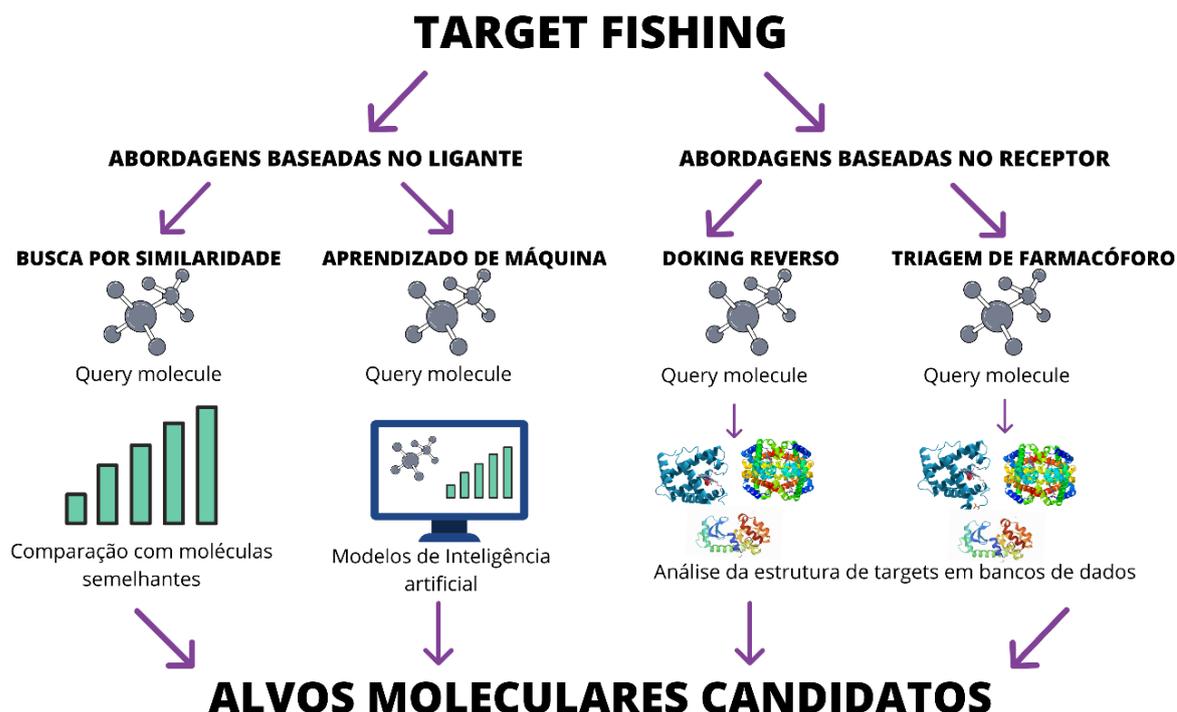
Ziegler et. al. (2013) cita os métodos convencionais de investigação de moléculas *multi-targets*. Os experimentos podem envolver diversas abordagens com modelos fenotípicos, enzimáticos, cromatografia de afinidade e subsequente análise por espectrometria de massas, além de outros métodos como estudos da produção

de mRNA. Tais abordagens, embora apresentem bons resultados, também possuem um custo elevado e podem despende muito tempo de realização.

Proporcionando uma abordagem abrangente do potencial farmacêutico com velocidades de execução menores e custos mais baixos, a pesquisa de moléculas *multi-targets* com ferramentas *in silico* surge como uma alternativa promissora, que pode guiar o futuro da química medicinal. As duas formas principais de prospecção *in silico* são o *virtual screening* (VS) e o *target fishing* (TF). No primeiro, procura-se nos bancos de dados moléculas candidatas a se ligarem a um alvo específico, cuja estrutura 3D é geralmente conhecida. Com base nas informações tridimensionais do alvo de interesse e dos candidatos a ligantes, os programas de VS selecionam candidatos para ensaios posteriores *in vitro* (MAIA *et. al.*, 2020).

O *target fishing*, por sua vez, possui um processo inverso: moléculas de interesse, apelidadas de *query molecule*, são adicionadas em bases de dados a fim de prever sua interação com uma gama de possíveis alvos. Essas análises podem ser focadas no ligante ou no receptor. A figura 1, adaptada de Galati *et. al.* (2021), esquematiza os tipos distintos de TF. As análises focadas no ligante partem da premissa de que a estrutura de uma molécula é essencial para o desenvolvimento de sua função biológica, e de que moléculas semelhantes possuem funções - e alvos moleculares - parecidos (GALATI *et. al.*, 2021).

Figura 1. Tipos de *Target fishing*.



Fonte: Adaptado de Galati et. al. (2021). Abordagens focadas no ligante não necessitam de uma estrutura 3D, embora algumas plataformas considerem essa forma de entrada. As abordagens focadas no receptor necessitam geralmente de informações tridimensionais dos possíveis alvos e da molécula que se deseja investigar.

Essas análises focadas no ligante podem ser realizadas por meio de buscas por similaridade em bases de dados ou por meio de programas que envolvam inteligência artificial. A primeira metodologia pode utilizar bancos que comportem informações em 2D ou 3D, ou ainda uma mistura das duas abordagens. As análises bidimensionais são as mais utilizadas, visto que não necessitam que o pesquisador possua todas as informações tridimensionais das *queries molecules*. Por não considerar as informações tridimensionais, essa abordagem costuma gerar uma grande quantidade de dados, de modo que costuma ser utilizada apenas como uma triagem inicial de alvos candidatos a estudos posteriores (GALATI et. al., 2021).

As similaridades entre moléculas são geralmente evidenciadas pela análise de *fingerprints*. O termo, que pode ser traduzido como impressão digital, é uma forma de assinatura digital das moléculas em bancos de dados. O principal tipo de *fingerprint* utilizado é o de Morgan, ou ECFP-4 (*Extended Connectivity FingerPrint*). Esse modo de assinatura considera cada átomo e seus vizinhos estruturais circulares. Desse

modo, os ECFPs adicionam *bits* que representam cada subestrutura de uma molécula, podendo conter milhares ou milhões de *bits* para descrever uma única estrutura de interesse (NETTLES et. al., 2006).

Entre as principais moléculas *multi-targets* que interessam à pesquisa farmacêutica, estão os produtos naturais (PN). Elrayess e El-Hak (2019), definem os PN como moléculas produzidas por organismos vivos, que comumente apresentam baixo peso molecular, embora algumas moléculas como peptídeos possam possuir um peso considerável. Essas moléculas possuem uma alta complexidade, com um espectro de atuação e uma diversidade funcional extremamente superior às moléculas sintetizadas em laboratório (ALMASRI, 2018).

A natureza promíscua dos produtos naturais, além da diversidade de estruturas entre as diferentes espécies ao redor do mundo, os torna ótimos candidatos para as pesquisas farmacológicas. Em termos de representatividade clínica, Newman & Cragg (2020) apontam que, até 2019, quando consideradas as moléculas de baixo peso molecular, os produtos naturais e seus derivados representavam cerca de 65% do total de estruturas aprovadas para o tratamento de neoplasias (NEWMAN & CRAGG, 2020).

Entre a grande diversidade de PNs, os organismos marinhos são uma importante fonte de moléculas bioativas candidatas para o desenvolvimento de fármacos. Wali e colaboradores (2021) apontam que o início do interesse em estudar o potencial farmacológico de moléculas marinhas se iniciou em meados dos anos 1940. Jimenez et. al. (2020), por sua vez, aponta que, dos sete produtos naturais de origem marinha utilizados na clínica, quatro são utilizados no tratamento anticâncer, a citarabina, a trabectedina, a eribulina e o brentuximab. Os quatro medicamentos fizeram parte de um grupo de cinco fármacos em testes clínicos nos últimos 14 anos. O quinto candidato, a plitidepsina, foi aprovada em alguns países, como a Austrália, entretanto, seu uso ainda não é permitido na Europa. A taxa de aprovação satisfatória desses produtos em menos de duas décadas reflete o potencial farmacológico escondido entre as águas dos ecossistemas marinhos (JIMENEZ et. al., 2020).

Os oceanos compõem cerca de 70% da superfície terrestre, apresentando uma biodiversidade riquíssima, embora ainda pouco conhecida. É digno de nota que 34 dos 36 filos de seres vivos conhecidos são exclusivamente marinhos, ou possuem representantes nos habitats oceânicos. O ambiente marinho é caracterizado por uma série diversa de pressões seletivas, tais como profundidade, salinidade, temperatura,

competições intra e interespecíficas e predação. Boa parte dos organismos marinhos são sésseis, de modo que precisam de artifícios químicos para garantir a sobrevivência, competindo com a mesma espécie ou grupos filogenéticos distintos por espaço, além de se protegerem da predação. Essa pressão seletiva leva à síntese de metabólitos secundários que podem ter potencial terapêutico (PERDICARIS et. al., 2013).

Semelhantes aos metabólitos secundários produzidos por invertebrados e plantas, grande parte das bactérias podem produzir moléculas que lhes conferem vantagens evolutivas, embora não sejam essenciais para o metabolismo primário desses indivíduos (HUG; KRUG; MÜLLER, 2020). Os microrganismos compõem grande parte da biomassa da Terra, ocupando vários nichos ecológicos nos mais diversos habitats do planeta. Ao se associarem com outros seres vivos, esses indivíduos podem ser patogênicos ou viverem como comensais/simbioses (KORMANEC et. al., 2020). Semelhante aos metabólitos liberados pelos invertebrados marinhos, as moléculas provenientes de microrganismos, especialmente de bactérias, podem ser utilizadas para o tratamento de doenças complexas como o câncer. Moléculas como a Salinosporamida A, isolada a partir de cepas marinhas de *Salinospora tropica* e discutida posteriormente neste trabalho, é um importante exemplo de PNs marinhos provenientes de microrganismos com utilidade para o câncer.

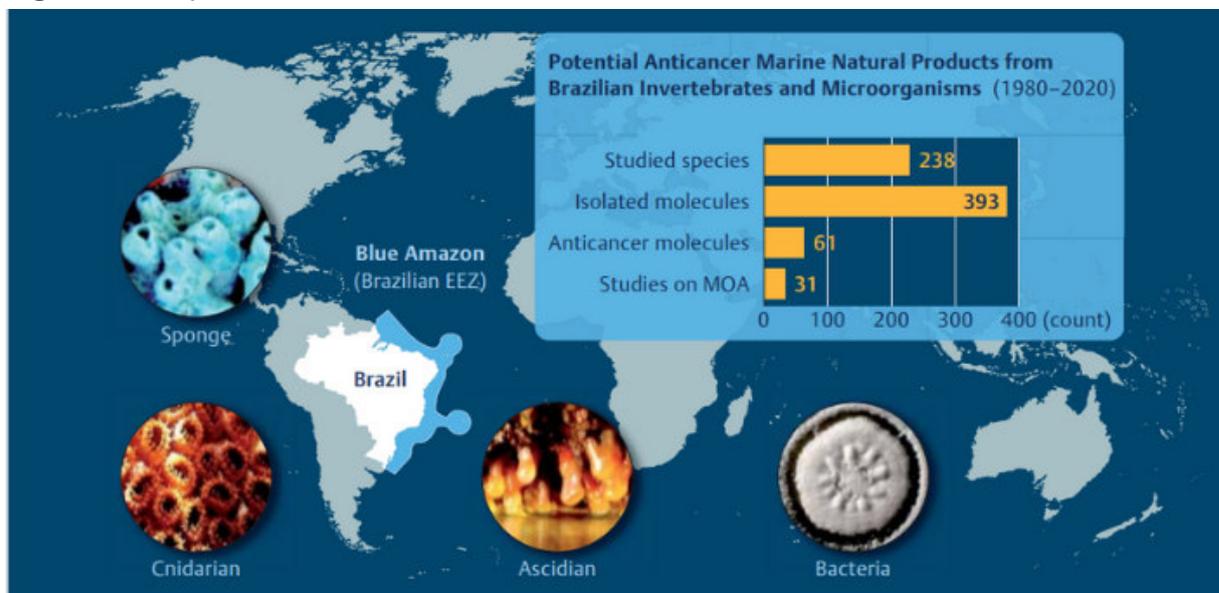
Uma vantagem da utilização de microrganismos se dá pela maior sustentabilidade da produção, visto que esses organismos podem ser cultivados em laboratório de forma mais viável e menos danosa às comunidades marinhas (WILSON et. al., 2014). Essas características de diversidade de espécies e potenciais inexplorados tornam os oceanos uma fonte promissora de produtos biotecnológicos e farmacêuticos.

O Brasil possui sob sua jurisdição 3,5 milhões de quilômetros quadrados de espaço marítimo. Esse território é chamado de Amazônia Azul, visto que sua extensão pode ser comparada à Amazônia Legal Brasileira, que possui cerca de 5 milhões de quilômetros quadrados. Além da extensão territorial, a Amazônia Azul guarda uma biodiversidade de valor e importância ecológica inestimáveis. Esse espaço é considerado uma Zona Econômica Exclusiva (ZEE) do país, e é utilizada para navegação, geração de energia, turismo, e obtenção de recursos, p.ex. através da pesca, obtenção de combustíveis fósseis, como o gás natural e o petróleo, e do

potencial biotecnológico da biodiversidade. As atividades desenvolvidas são importantíssimas para a soberania econômica brasileira. O Brasil reivindica, junto à Organização das Nações Unidas, a ampliação da Amazônia Azul, de modo que a área total se torne superior a 5,6 milhões de quilômetros quadrados, ultrapassando a Floresta Equatorial Amazônica (IBGE, 2020; MARINHA DO BRASIL, 2019).

Apesar de extensa, compreendendo áreas tropicais e subtropicais, pouco se conhece da diversidade biológica presente na Amazônia Azul. Projetos como o BIOTA e o SISBIOTA foram desenvolvidos para identificação e caracterização da diversidade de espécies endêmicas e culminaram com o descobrimento de espécies antes desconhecidas, todavia, estima-se que a diversidade conhecida até o momento seja uma pequena fração do todo (MILOSLAVICH et. al., 2011). Quanto à descoberta de produtos naturais marinhos brasileiros, em especial, os antitumorais (figura 2), um levantamento realizado por Wilke e colaboradores (2021) aponta que das 393 moléculas isoladas entre 1980 e 2020, 63 possuíam potencial anticâncer, e destas 31 foram estudadas quanto ao seu mecanismo de ação.

Figura 2. Mapa-múndi destacando o Brasil e sua Zona Econômica Exclusiva.



Fonte: Wilke *et. al* (2021). Os gráficos inseridos no mapa permitem a visualização do potencial de espécies identificadas como produtoras de substâncias potencialmente antitumorais, a quantidade de moléculas isoladas e a fração destas que estão em investigações de mecanismos de ação. As fotos presentes exploram os grupos de seres vivos explorados, entre bactérias e invertebrados marinhos.

O MicroMarin é um banco de microrganismos isolados em diferentes pontos da Amazônia Azul, desde o Sul do Brasil até ilhas continentais, passando pelas regiões Sudeste e Nordeste do país. O banco conta com mais de quase 1400 bactérias isoladas de diferentes fontes, desde sedimentos, até invertebrados marinhos

como ascídias, esponjas e corais. Após a identificação e catalogação, as cepas são criopreservadas e permitem o estudo do potencial biotecnológico, como a citotoxicidade. Dentro de um contexto de tratamento anticâncer, a busca de mecanismos citotóxicos é extremamente útil, visto que essas características podem levar as células tumorais à morte. A avaliação da toxicidade de extratos bacterianos permitiu a identificação e o isolamento de diversas moléculas citotóxicas, incluindo algumas inéditas. Trabalhos do nosso grupo investigam o efeito dessas moléculas bioativas em linhagens tumorais, e o mecanismo de ação *in vitro*.

2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Devido à sua natureza polifarmacológica, a investigação de novos produtos naturais, especialmente os marinhos, pode fornecer novas opções de tratamento para doenças complexas. Essas enfermidades, em especial os cânceres, ocupam o topo das causas de morte nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, causando prejuízos à população mundial e sofrimento àqueles que as enfrentam (COSTANTINO; BARLOCCO, 2013; WHO, 2020).

O Brasil possui uma área ampla e diversa de ecossistemas marinhos, com uma biodiversidade ainda pouco conhecida. Projetos visando a caracterização das espécies da Amazônia Azul, bem como a identificação de moléculas bioativas produzidas, permitirão o avanço de áreas como a farmacologia e ecologia, haja vista que esses compostos possuem funções ecológicas e evolutivamente relevantes, mas tornarão possíveis ações de conservação da biota presente no espaço marítimo brasileiro (MILOSLAVICH et. al., 2011; WILKE et. al., 2021).

Os pesquisadores parceiros que mantêm o MicroMarin atuam coletando, catalogando e caracterizando as bactérias presentes nos mares brasileiros, desde as de vida livre, àquelas associadas aos invertebrados marinhos. Amostras coletadas em toda a Amazônia Azul tornam o banco um local representativo e possibilita inúmeras investigações, tanto relacionadas à diversidade dessas cepas, quanto das moléculas que podem ser sintetizadas por elas. Haja vista que o foco do grupo é a investigação e prospecção de moléculas com potencial citotóxico, a maioria das moléculas identificadas até o momento passaram por triagens e metodologias que às filtraram para este propósito. Quais os outros mecanismos celulares que essas moléculas podem desempenhar? A pertinência desta pergunta está relacionada principalmente às limitações das metodologias de pesquisa experimentais, que não investigam com qualidade as características *multi-targets* dos produtos estudados.

Os métodos de pesquisa convencionais, embora viáveis e indispensáveis para a descoberta de novos compostos bioativos, limita a capacidade de investigação de vários alvos, principalmente por questões de tempo e recursos. Deste modo, abordagens *in silico* podem ser capazes tanto de explorar novas aplicações para moléculas conhecidas, quanto filtrar candidatos para abordagens experimentais. Assim, a investigação *in silico* do potencial biotecnológico das moléculas identificadas pelas bactérias do MicroMarin podem fornecer novas possibilidades de estudos, tanto

relacionados à investigação experimental de mecanismos de ação, quanto de características ainda não exploradas das moléculas do banco.

Por fim, alvos que se destacam na abordagem de *target fishing* podem - e devem - passar por novas metodologias, computacionais e experimentais, a fim de concluir se a interação ocorre ou não. Metodologias subsequentes como *docking* molecular podem fornecer informações importantes sobre o perfil de interação dos compostos com seus alvos, guiando pesquisas *in vitro* que avaliarão se as interações se mantêm diante da complexidade dos sistemas celulares e biológicos.

Este trabalho contará com dois capítulos. No primeiro, serão discutidos os perfis das bactérias presentes do MicroMarin, das moléculas isoladas ou identificadas nas cepas, e os resultados de *target fishing* obtidos em três bancos de dados distintos. No segundo capítulo, as moléculas e os alvos que se destacaram na primeira fase serão caracterizados e discutidos com base na literatura.

3. OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS

3.1. Objetivo Geral

Investigar, por meio de abordagens *in silico*, possíveis alvos moleculares das moléculas identificadas ou isoladas de bactérias marinhas do MicroMarin.

3.2. Objetivos Específicos

- Identificar as cepas produtoras de compostos citotóxicos em trabalhos relacionados ao MicroMarin;
- Catalogar e caracterizar as moléculas identificadas;
- Desenhar as estruturas químicas e gerar o código SMILES;
- Determinar, por meio de *target fishing*, o potencial biotecnológico das moléculas do banco;
- Discutir, com base na literatura, as moléculas e os alvos em destaque.

4. CAPÍTULO 1 - LEVANTAMENTO, CATALOGAÇÃO E *TARGET FISHING* DAS MOLÉCULAS IDENTIFICADAS DAS BACTÉRIAS DO MICROMARIN.

4.1. Considerações iniciais

Nesta seção serão apresentados os procedimentos iniciais deste trabalho, desde o levantamento das moléculas e bactérias de interesse, a escolha dos bancos de dados utilizados aos resultados do *target fishing*.

4.2. Metodologia

Todos os compostos utilizados neste trabalho foram identificados a partir de estudos realizados com extratos de bactérias do banco de microrganismos do grupo, o MicroMarin. O banco conta com 1393 cepas, divididas entre o Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia Marinha da Universidade Federal do Ceará (LaBBMar - UFC) e o Laboratório de Farmacologia Marinha da Universidade de São Paulo (LaFarMar - USP). A curadoria do banco é responsabilidade de três professores pesquisadores, o Dr. Diego Veras Wilke (UFC), a Dra. Letícia Lotufo (USP) e a Dra. Paula Jimenez (Unifesp). As cepas são nomeadas como BRAs (UFC) e BRBs (USP), seguidas de uma ordem numérica, a fim de identificar o local de armazenamento, e são isoladas tanto de invertebrados marinhos, quanto do sedimento da costa brasileira e de ilhas continentais. As amostras estão catalogadas em uma planilha criada e mantida atualizada periodicamente pelos pesquisadores do grupo. Nela são cadastradas e atualizadas diversas informações como código, informações da coleta, características morfológicas e identificação da espécie, caso tenha sido utilizada para o desenvolvimento de um projeto. Ensaios de citotoxicidade realizados também são adicionados à planilha a fim de diferenciar aquelas que se mostraram bioativas. Para este trabalho serão consideradas somente as cepas com o código BRA, presentes no LaBBMar.

O MicroMarin conta com dezenas de profissionais parceiros, desde estudantes de graduação em cursos correlatos, como Ciências Biológicas, Biotecnologia e Farmácia; à alunos de pós-graduação em programas de química, ecologia e farmacologia que fazem parte da Rede SISBIOTA-MAR. Dentre vários colaboradores a Dra. Otilia Pessoa, do Departamento de Química Orgânica e

Inorgânica (UFC) desempenha um importante papel no isolamento e identificação de moléculas dos extratos orgânicos das bactérias do MicroMarin.

Trabalhos anteriormente realizados pelo grupo, incluindo artigos (ARTHAUD et. al., 2012; FERREIRA et. al., 2016; FURTADO et. al., 2021; GUIMARÃES et. al., 2014; PINTO et. al., 2020; SILVA et. al., 2017; SILVA et. al., 2019a; SILVA et. al., 2019b; SOUSA et. al., 2012), monografias (FURTADO, 2017; MARINHO, 2021; NOGUEIRA, 2019), dissertações (ABREU, 2013; FLORÊNCIO, 2017; SAHM, 2014; SIQUEIRA, 2018; SILVA, 2016) e teses (FERREIRA, 2014; PINTO, 2017) foram consultados para listar as moléculas identificadas em extratos que apresentaram atividade citotóxica contra células tumorais. A planilha do MicroMarin foi utilizada para um primeiro levantamento dos trabalhos do grupo, bem como das informações das cepas utilizadas, seus locais de coleta e características morfológicas. As outras produções foram encontradas no repositório institucional da UFC. Por fim, trabalhos ainda não publicados também foram utilizados, excetuando as moléculas inéditas.

Com base no levantamento bibliográfico, foi criada uma primeira planilha, disponível em sua totalidade no APÊNDICE A deste trabalho. A figura 3 exemplifica a organização do levantamento. Na primeira triagem, as moléculas foram catalogadas com base nos trabalhos onde apareciam. O levantamento se utilizou de informações como as cepas de onde os produtos foram identificados, o nome dos compostos e a classe química a qual pertencem. Nos trabalhos que apresentavam testes de citotoxicidade também foram consideradas as informações experimentais, como os valores da concentração inibitória média (CI50), as linhagens celulares testadas e o tempo de incubação do experimento.

Figura 3. Planilha de levantamento das moléculas identificadas do MicroMarin.

Artigos onde aparece	CEPA	Informações da Molécula		Atividade		
		Nome	Classe Química	Citotoxicidade (Valor IC50)	Linhagem	Tempo
Revisão Wilke <i>et al</i> (2021)						
Pinto FCL, Silveira ER, Vasconcelos ACL, Florêncio KGD, Oliveira FAS, Salm BB, Costa-Lotufo LV, Bauermeister A, Lopes NP, Wilke DV, Pessoa ODL. Dextrorotatory chromomycins from the marine Streptomyces sp. associated to Palythoa caribaeorum. J Braz Chem Soc 2020; 31: 143–152	BRA-384	Cromomicina A5	Cromomicinas	3,7 nM MCF-7, 0,4 nM HCT-116, 0,8nM 501-mel, 0,2nM MM-200, 7,9nM PC-3M	MCF-7 (Carcinoma de mama), HCT-116, 501-mel (melanoma metastático), MM-200 (melanoma metastático), PC-3M (Câncer de próstata metastático)	72h
		Cromomicina A6		14,1 nM MCF-7, 3,5 nM HCT-116, 2,3 nM 501-mel, 2,6 nM MM-200, 67,8 nM PC-3M		
		Cromomicina A7		133,0 nM MCF-7, 47,3 nM HCT-116, 49,0 nM 501-mel, 39,1 nM MM-200, n.t. PC-3M		
		Cromomicina A8		10,5 nM MCF-7, 1,4 nM HCT-116, 1,6 nM 501-mel, 0,8 nM MM-200, 88,3 nM PC-3M		
Sousa TS, Jimenez PC, Ferreira EG, Silveira ER, Braz-Filho R, Pessoa OD, Costa-Lotufo LV. Anthracyclinones from Micromonospora sp. J Nat Prod 2012; 75: 489–493	BRA 009	4,6,11-trihydroxy-9-propyltetracene-5,12-dione	Antraciclina	12,7 uM	HCT-8	72h
		4-methoxy-9-propyltetracene-6,11-dione		>70 uM		
		7,8,9,10-tetrahydro-9-hydroxy-4-methoxy-9-propyltetracene-6,11-dione		-		
		10 β -carbomethoxy-7,8,9,10-tetrahydro-4,6,7a,9a,11-pentahydroxy-9-propyltetracene-5,12-dione		6,2 uM		
Guimarães LA, Jimenez PC, Sousa TDS, Freitas HPS, Rocha DD, Wilke DV, Martín J, Reyes F, Pessoa ODL, Costa-Lotufo LV. Chromomycin A2 induces autophagy in melanoma cells.	BRA-090	Cromomicina A2	Cromomicina	HCT - 116 (21,6nM em 48h e 6,3nM em 72h) // MALME-3M (16,7nM em 48h e 18,7nM em 72h)	HCT -116 / MALME-3M (melanoma metastático)	48h/72h

Fonte: Autor.

Após a catalogação inicial, os compostos foram novamente divididos em outra tabela, desta vez por classe química. Isso possibilitou a remoção de duplicatas, além de uma primeira visualização da diversidade de compostos do MicroMarin.

Completada a catalogação das moléculas de interesse, foi iniciada a fase de desenho das estruturas para obtenção dos códigos SMILES, utilizados posteriormente para a prospecção *in silico* dos compostos. A construção da estrutura das moléculas foi realizada com o auxílio da plataforma ChemDraw online (<https://chemdrawdirect.perkinelmer.cloud/js/sample/index.html#>). Semelhante ao aplicativo para Desktop, o ChemDraw permite o desenho de moléculas por meio de elementos pré-definidos, como ligações simples, anéis aromáticos, entre outros. Os desenhos das estruturas químicas das moléculas foram revisados pelo Dr. Francisco das Chagas Lima Pinto, do Laboratório de Análise Fitoquímica de Plantas Medicinais (LAFIPLAM), do Departamento de Química da Universidade Federal do Ceará, colaborador do grupo. A representação das estruturas como SMILES dos compostos, descritos a seguir, foi criada também no ChemDraw para que pudéssemos analisá-los nos bancos de dados.

O SMILES, do inglês “*simplified molecular input line entry specification*” é um modo de representação de estruturas químicas somente com caracteres normais, típicos de teclados alfanuméricos. A descrição das estruturas é feita de forma única, de modo que moléculas diferentes não possam ter um código igual. A IUPAC adota o

InChi (*International Chemical Identifier*) como o padrão de representação de estruturas, contudo, grande parte dos bancos de dados existentes utilizam os SMILES. Desse modo, ao inserir o código SMILES nos bancos de dados, ele é convertido em informações estruturais, que por sua vez são comparadas com a estrutura de outras moléculas das plataformas, a fim de obter, por meio da similaridade, possíveis alvos moleculares.

A fase seguinte ao desenho/obtenção dos SMILES foi a prospecção *in silico* do potencial biotecnológico. Três bancos de dados distintos, TargetNet, MolTarPred e PassOnline foram utilizados.

O TargetNet (<http://targetnet.scbdd.com/calcnnet/index/>), desenvolvido por Yao e colaboradores (2016) verifica a interação da molécula inserida pelo usuário com pelo menos 623 proteínas, presentes no banco de dados UniProt. Semelhante às outras bases de dados consultadas para este trabalho, a plataforma se baseia no método de relação estrutura-atividade (QSAR, do inglês *Quantitative structure-activity relationship*). Ao adicionar a *query molecule*, por meio do código SMILES, a plataforma calcula a possível interação com as proteínas do banco e gera um arquivo comparando a probabilidade de ligação com as 623 proteínas. Por se tratarem de valores de probabilidade, os números variam entre 0.0 e 1.0, sendo 0.0 sem interação e 1.0 com maior probabilidade de o alvo ser verdadeiro (YAO et. al., 2016).

O TargetNet permite diferentes tipos de análises dentro do universo da plataforma, podendo ser alterados tantos os modelos de análise, quanto o tipo de *fingerprints* utilizados. Neste trabalho, foi utilizado o modelo AUC e o ECFP4 *fingerprints*. Yao et. al. (2016) sinaliza em seu artigo que o AUC é o modelo com melhores resultados, e o que melhor se relaciona com o ECFP4, que por sua vez é o *fingerprint* mais popular, sendo sugerido pelo artigo como o que obtém as melhores predições. Foi adicionado um limiar de corte de 0.9, a fim de filtrar uma quantidade menor de *targets* e uma maior probabilidade de interação.

O MolTarPred (<https://moltarpred.marseille.inserm.fr/>), desenvolvido por Péon e colaboradores (2019), por sua vez, utiliza o banco de dados ChEMBL para a obtenção de dados de pelo menos 4.550 *targets* e de mais de 600.000 biomoléculas para comparação de estrutura. Após a entrada da *query molecule* por meio do código SMILES, a plataforma compara a estrutura inserida com as presentes no banco de dados e gera um resultado relacionado às 10 moléculas mais semelhantes à inserida. Os autores do site discorrem em seu artigo que pesquisas realizadas pelo grupo

apontam que utilizar as 10 moléculas mais relacionadas aumentam a confiança da análise, de modo que se utilizada uma quantidade menor, pode-se prever menos alvos que os esperados, e se utilizadas mais de uma dezena, aumenta-se a taxa de erro da predição (PÉON *et. al.*, 2019).

Sobre os resultados no MolTarPred, após o sistema escolher as moléculas semelhantes, analisa os possíveis *targets* e gera um resultado com base na confiabilidade (no termo em inglês, *reliability*), numa escala de 1 a 10. Onde o primeiro nível significa que 10% das moléculas comparadas geram *hits* com o alvo, e o último significa que todas as moléculas comparadas geraram *hits*. Moléculas que obtêm um valor 10 nas análises, possuem cerca de 93% de chances de serem um *target* verdadeiro (PÉON *et. al.*, 2019). A fim de padronizar os resultados nas três bases de dados, consideramos neste trabalho apenas os *targets* que obtiveram notas 9 e 10 de confiabilidade na plataforma.

Por fim, o PassOnline (<http://www.way2drug.com/passonline/predict.php>) (FILIMONOV *et. al.*, 2014) prevê a possível atividade biológica, incluindo toxicidade, das moléculas inseridas. Os cálculos baseados na relação estrutura-atividade utilizam moléculas de vários bancos de dados, em fases clínicas e pré-clínicas de estudo, de modo que contenham informações sobre os efeitos terapêuticos e adversos. Ao invés de utilizar os *fingerprints* para representação das moléculas, o site utiliza um método de representação desenvolvido pelos próprios autores, a “vizinhanças multiníveis de átomos”, ou MNA, do inglês *multilevel neighborhoods of atoms*. Nesse método de assinatura, os tipos de ligação não são considerados e os hidrogênios podem ou não ser incluídos, a depender de sua valência e carga parcial (FILIMONOV *et. al.*, 2014).

Além de prever a possível atividade biológica, e não apenas os *targets*, o PassOnline tem como diferencial a geração de duas probabilidades: A de a molécula ser ativa (P_a) para a função, e a de ser inativa (P_i). Os cálculos para a obtenção dessas estatísticas se baseiam na abordagem Bayesiana e é matematicamente discutida no artigo de lançamento da plataforma (FILIMONOV *et. al.*, 2014).

Os métodos de saída do site permitem adicionar *thresholds* de probabilidade de P_a maiores que 0,3 e maiores que 0,7, sendo esta última a escolhida por grande parte dos trabalhos que utilizam a plataforma por ser mais estrigente. Também é possível selecionar apenas moléculas cuja probabilidade de ser ativa supera a de não o ser. Para este trabalho, consideramos apenas os *hits* cuja P_a fosse

maior que Pi e maior que 0,9, com o intuito de padronizar com as outras duas plataformas utilizadas.

Os resultados foram adicionados em tabelas, considerando os resultados de cada molécula obtida no levantamento bibliográfico em cada uma das três plataformas. De modo a organizar a planilha, as estruturas catalogadas também foram divididas em seções com 1 ou mais classes, a depender da quantidade de representantes. Esses primeiros resultados permitiram a visualização do potencial biotecnológico geral das moléculas do MicroMarin. O primeiro capítulo deste trabalho propõe uma análise inicial da riqueza e diversidade química e biotecnológica das bactérias produtoras de compostos citotóxicos do banco de microrganismos do grupo de pesquisa.

4.3 Resultados

4.3.1. Levantamento Bibliográfico

Para a construção deste trabalho, foram consultados 21 trabalhos, sendo 9 artigos publicados em periódicos, 3 monografias, 5 dissertações, 2 teses e 2 artigos ainda não publicados. Esses trabalhos foram escolhidos por se tratarem de publicações de membros do grupo de pesquisa que envolvem moléculas identificadas em bactérias marinhas. A relação dos trabalhos, incluindo as publicações onde aparecem, as cepas utilizadas e as moléculas estão presentes no APÊNDICE A. Informações de citotoxicidade das moléculas isoladas também foram adicionadas, bem como as linhagens testadas e o tempo de incubação dos ensaios. No APÊNDICE A também estão presentes moléculas de artigos ainda não publicados, que foram considerados para esta monografia por não se tratarem de moléculas inéditas.

4.3.2. Perfil das bactérias do banco

Trinta cepas foram utilizadas pelos trabalhos consultados, como ilustra a tabela 1. Encontram-se microrganismos isolados a partir de sedimentos ou de invertebrados marinhos como as espécies de ascídias (Chordata, Ascidiacea) *Eudistoma vancouveri* e *Euhermania* sp. e dos corais (Cnidaria, Anthozoa) *Palythoa caribaeorum*, *Palythoa variabilis* e *Zoanthus sociatus*. As amostras foram coletadas ao longo do nordeste brasileiro, desde praias do Ceará, como Taíba, Pecém e Mucuripe, aos arquipélagos de São Pedro e São Paulo (ASPSP) e de Fernando de Noronha,

pertencentes ao Estado de Pernambuco. As únicas cepas representadas que não pertencem ao Nordeste são provenientes das ilhas de Trindade e Martim Vaz, território do Estado de Espírito Santo, na Região Sudeste do Brasil.

Tabela 1. Relação das cepas utilizadas nos trabalhos consultados. (continua)

Cepa	Gênero da Bactéria	Onde foi isolada	Local
BRA - 006	-	<i>Eudistoma vannamei</i>	Taíba-CE
BRA - 007	<i>Pseudoalteromonas</i>	Sedimento	Taíba-CE
BRA - 010	<i>Micromonospora</i>	<i>Eudistoma vannamei</i>	Taíba-CE
BRA - 016	<i>Streptomyces</i>	Sedimento	Mucuripe - CE
BRA - 022	<i>Micromonospora</i>	Sedimento	Pecém-CE
BRA - 034	-	<i>Palythoa caribaeorum</i>	Taíba-CE
BRA - 035	<i>Streptomyces</i>	<i>Palythoa variabilis</i>	Taíba-CE
BRA - 036	-	<i>Palythoa variabilis</i>	Taíba-CE
BRA - 060	<i>Streptomyces</i>	<i>Palythoa variabilis</i>	Taíba-CE
BRA - 090	<i>Streptomyces</i>	Sedimento	Paracuru-CE
BRA - 132	<i>Salinispora</i>	Sedimento	ASPSP
BRA - 177	<i>Actinomadura</i>	Sedimento	ASPSP
BRA - 199	<i>Streptomyces</i>	Sedimento	ASPSP
BRA - 203	<i>Halomonas</i>	Sedimento	ASPSP
BRA - 213	<i>Salinispora</i>	Sedimento	ASPSP
BRA - 342	<i>Pseudovibrio</i>	<i>Euherdmania sp.</i>	Taíba-CE
BRA - 346	<i>Streptomyces</i>	<i>Euherdmania sp.</i>	Taíba-CE
BRA - 383	-	<i>Palythoa variabilis</i>	Paracuru-CE
BRA - 384	<i>Streptomyces</i>	<i>Palythoa caribaeorum</i>	Paracuru-CE
BRA - 399	<i>Streptomyces</i>	Sedimento	Fernando de Noronha-PE
BRA - 479	-	<i>Palythoa caribaeorum</i>	Trindade e Martim Vaz-ES
BRA - 480	-	<i>Palythoa caribaeorum</i>	Trindade e Martim Vaz-ES

Tabela 1. Relação das cepas utilizadas nos trabalhos consultados. (conclusão)

BRA - 481	-	<i>Palythoa caribaeorum</i>	Trindade e Martim Vaz-ES
BRA - 489	<i>Micromonospora</i>	<i>Palythoa caribaeorum</i>	Trindade e Martim Vaz-ES
BRA - 490	-	<i>Palythoa caribaeorum</i>	Trindade e Martim Vaz-ES
BRA - 535	-	<i>Zoanthus sociatus</i>	Fernando de Noronha-PE
BRA - 551	-	<i>Zoanthus sociatus</i>	Fernando de Noronha-PE
BRA - 585	-	<i>Palythoa variabilis</i>	Taíba-CE
BRA - 612	<i>Pseudovibrio</i>	Sedimento	Taíba-CE
BRA - 617	-	<i>Zoanthus sociatus</i>	Atol das Rocas-RN

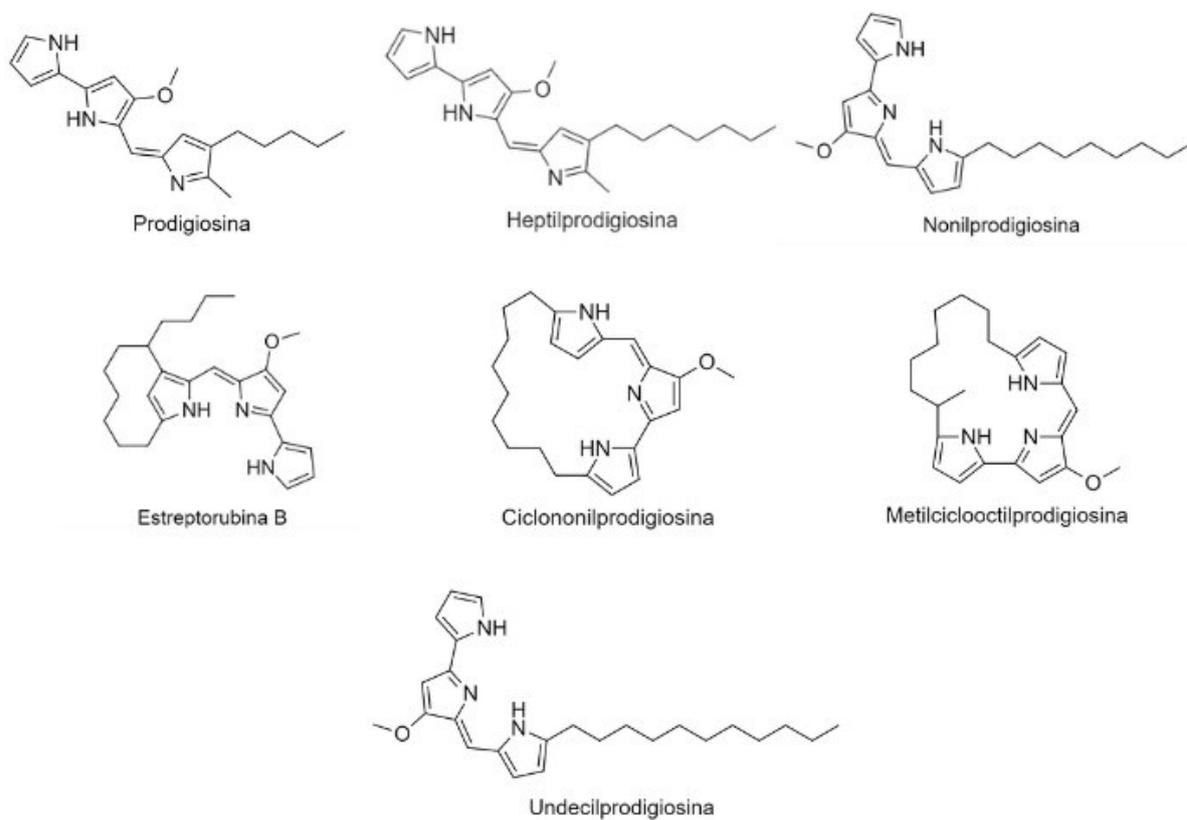
Fonte: Autor.

Dos sete gêneros de bactérias identificados, quatro (*Actinomadura*, *Micromonospora*, *Salinispora* e *Streptomyces*) são actinomicetos, bactérias Gram-positivas que apresentam crescimento filamentosos. Os outros três gêneros (*Halomonas*, *Pseudoalteromonas* e *Pseudovibrio*) são bactérias Gram-negativas.

4.3.3. Moléculas identificadas

O levantamento realizado permitiu a catalogação de 97 moléculas, pertencentes a 17 classes químicas distintas. As figuras seguintes apresentam as moléculas apresentadas por classe química. A figura 4 ilustra as prodigininas, das quais sete moléculas foram avaliadas nos trabalhos consultados.

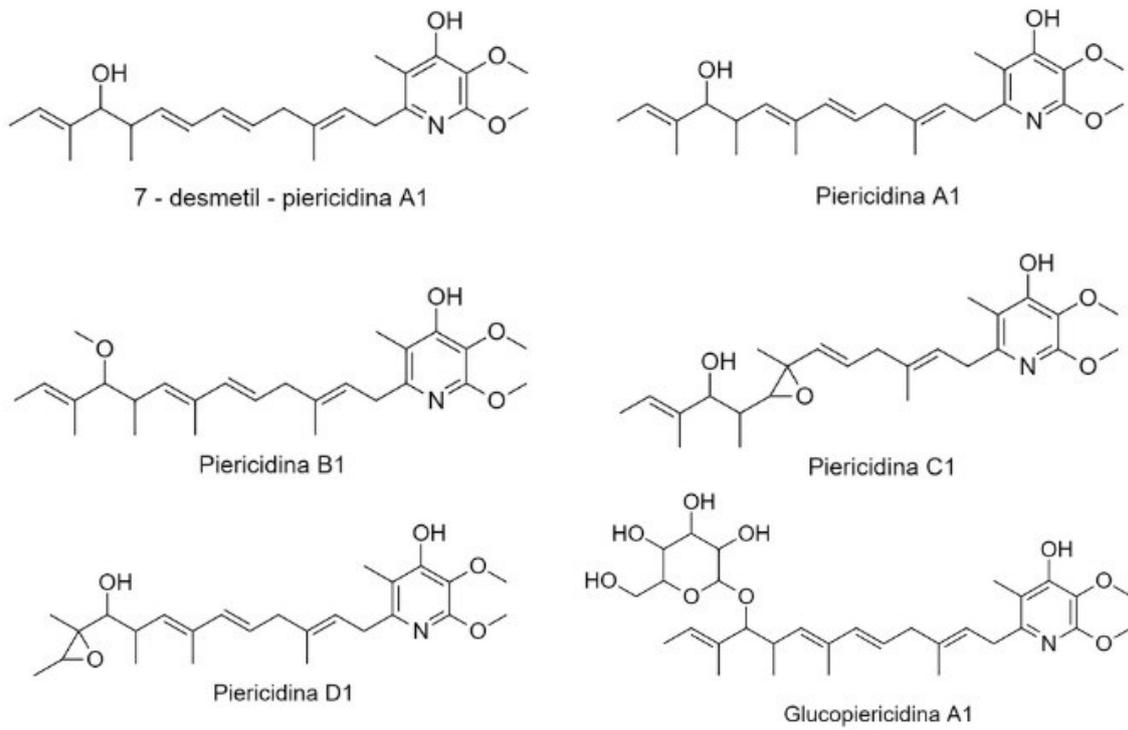
Figura 4. Prodiginas identificadas no MicroMarin.



Fonte: Autor.

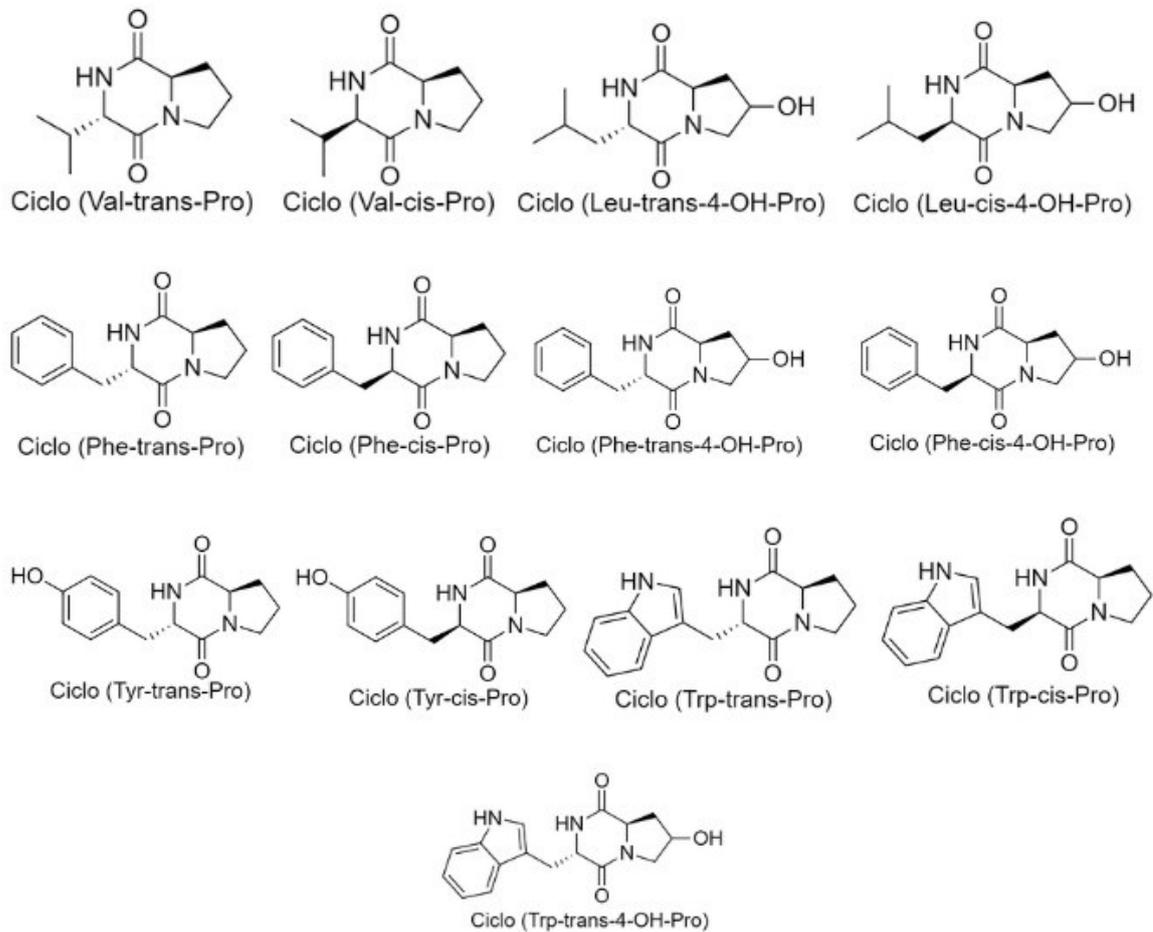
A figura 5 representa as estruturas das seis piericidinas encontradas nos trabalhos consultados. A figura 6 ilustra as 13 dicetopiperazinas que apareceram nos diversos trabalhos publicados pelo grupo

Figura 5. Piericidinas identificadas no MicroMarin.



Fonte: Autor.

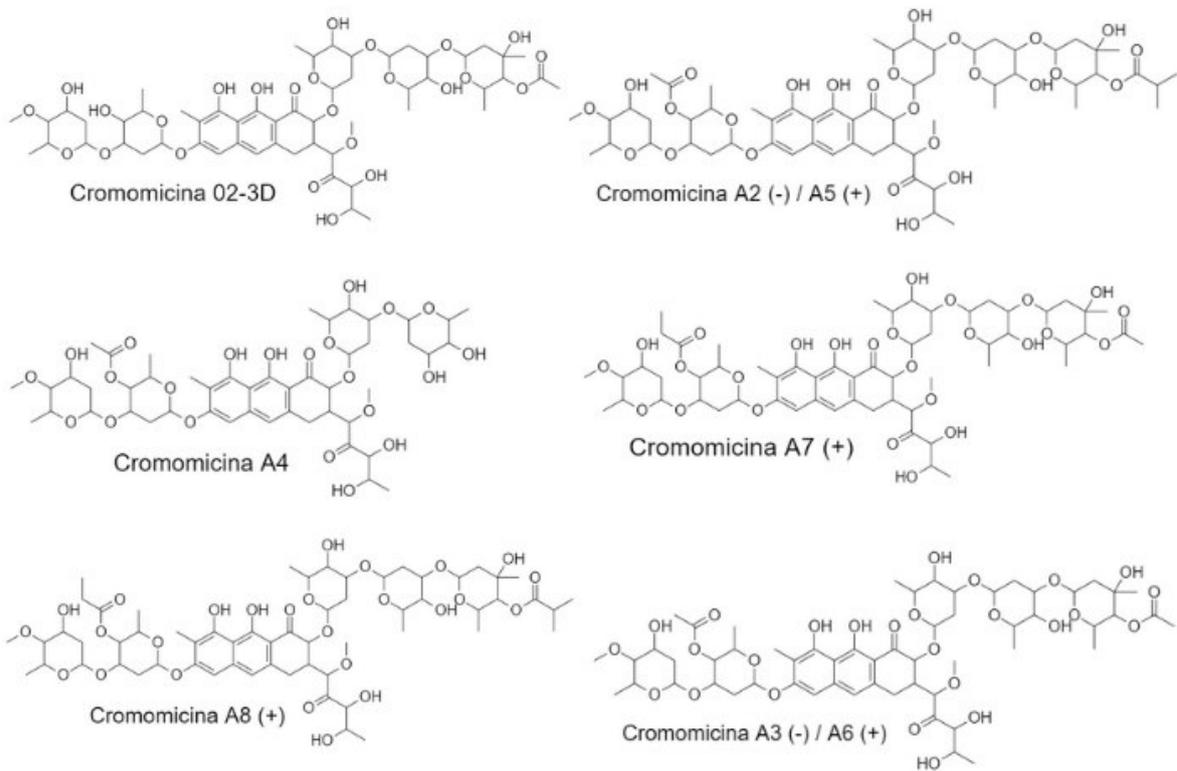
Figura 6. Diketopiperazinas identificadas no MicroMarin.



Fonte: Autor.

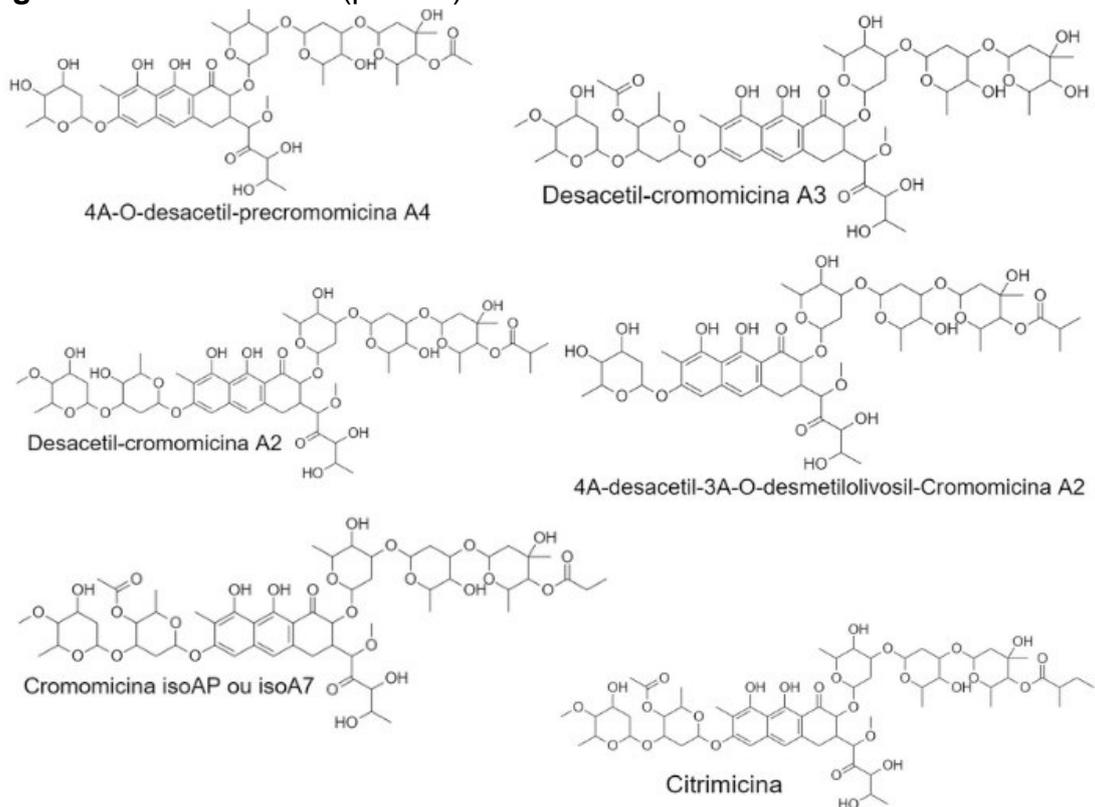
As figuras 7 e 8 representam as cromomicinas identificadas nos trabalhos do grupo.

Figura 7. Cromomicinas (parte 1) identificadas no MicroMarin.



Fonte: Autor.

Figura 8. Cromomicinas (parte 2) identificadas no MicroMarin.



Fonte: Autor.

As figuras 9, 10 e 11, apresentam, na ordem, as estruturas das antraciclínicas, estaurosporinas e salinictais. A figura 12 apresenta as rifamicinas.

Figura 9. Antraciclínicas identificadas em bactérias do MicroMarin.

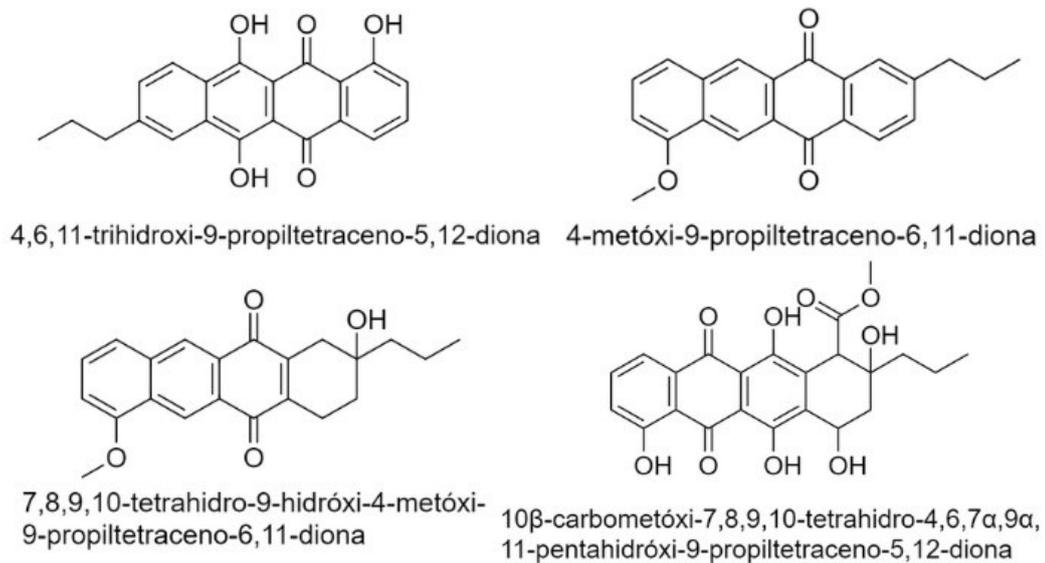


Figura 10. Estaurosporinas identificadas em bactérias do MicroMarin.

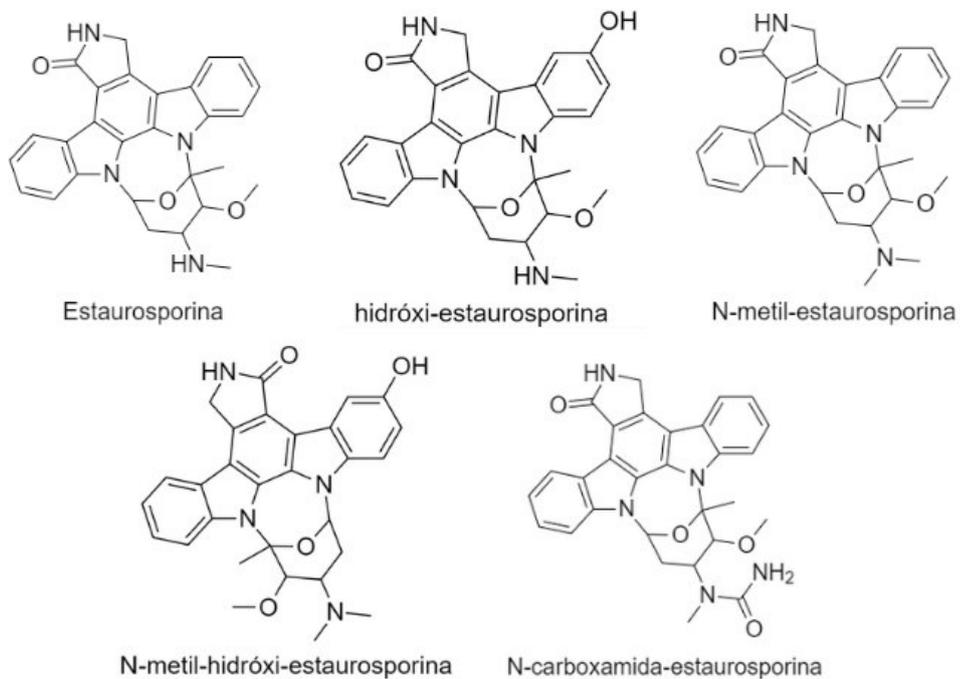
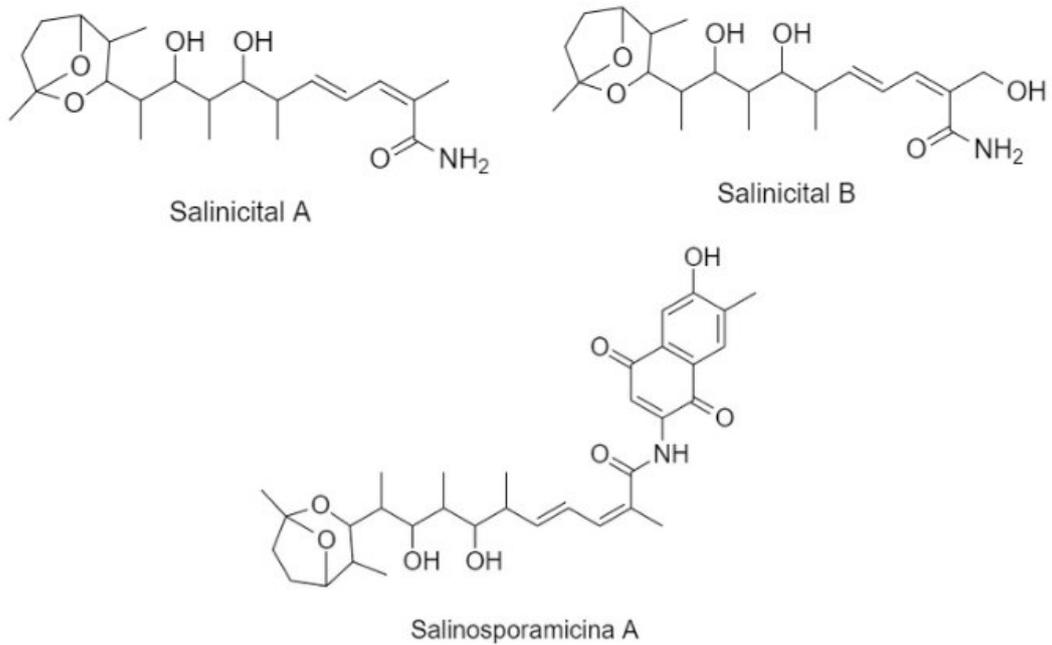
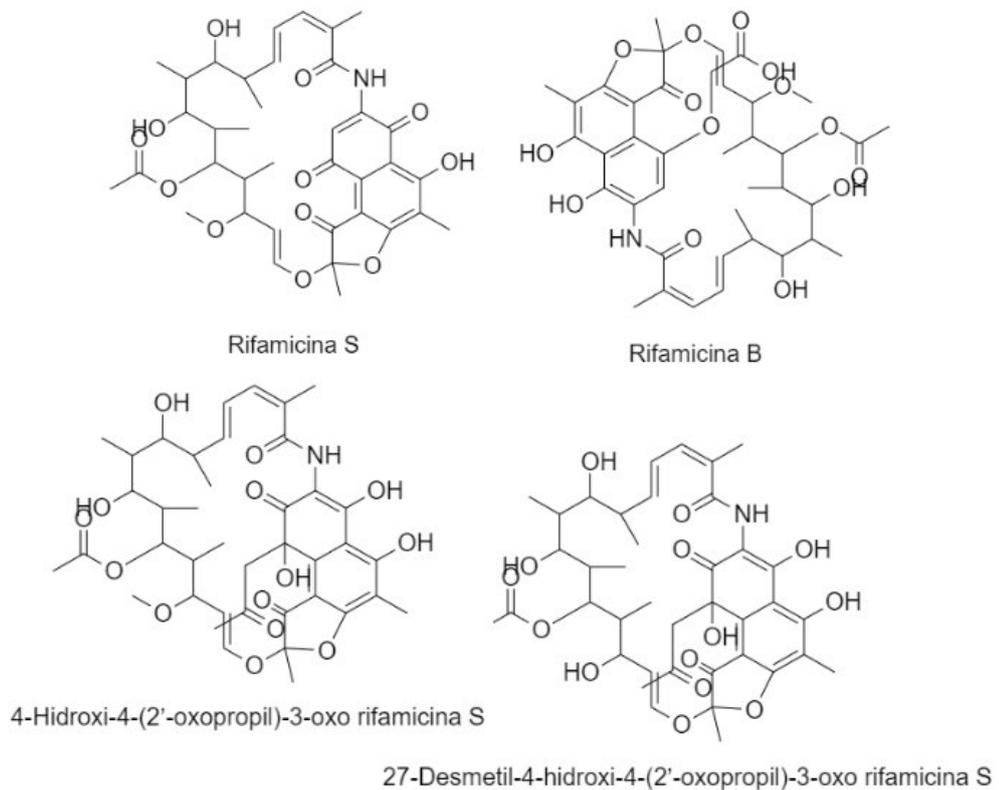


Figura 11. Salinictais identificados em bactérias do MicroMarin.



Fonte: Autor.

Figura 12. Rifamicinas identificadas em trabalhos do MicroMarin.



Fonte: Autor.

As figuras 13 e 14 apresentam as estruturas das isatinas e das nafitoquinonas identificadas nos trabalhos com bactérias do MicroMarin.

Figura 13. Isatinas identificadas em trabalhos do MicroMarin.

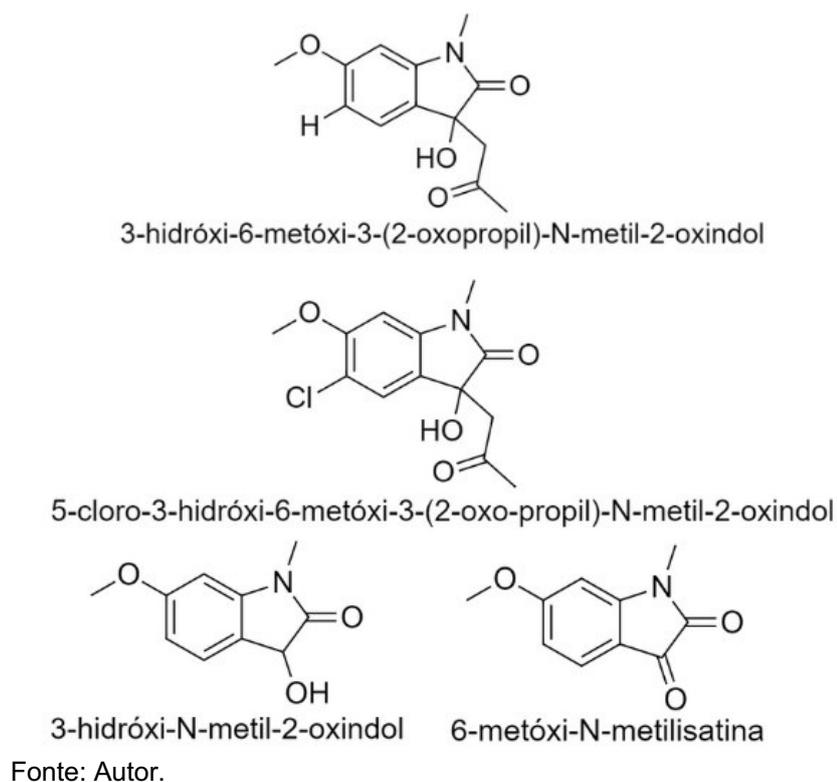
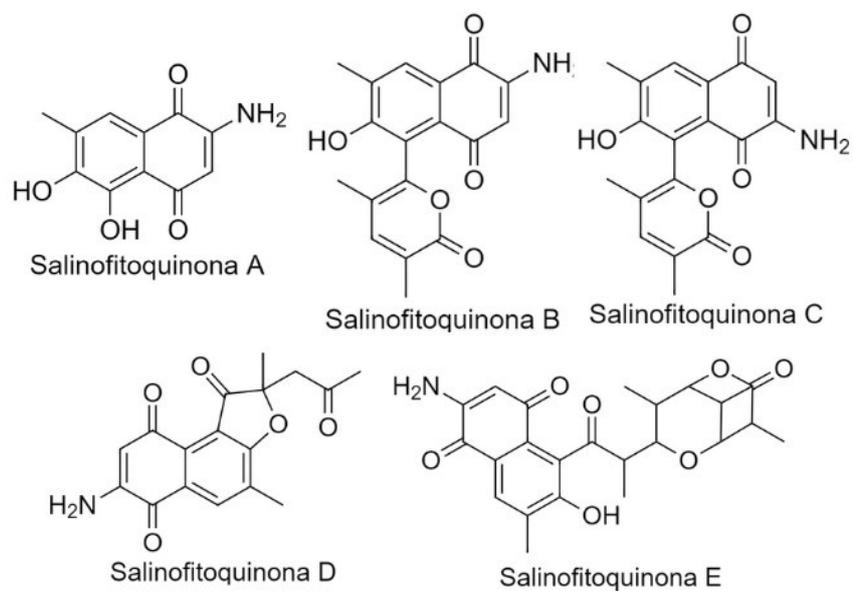
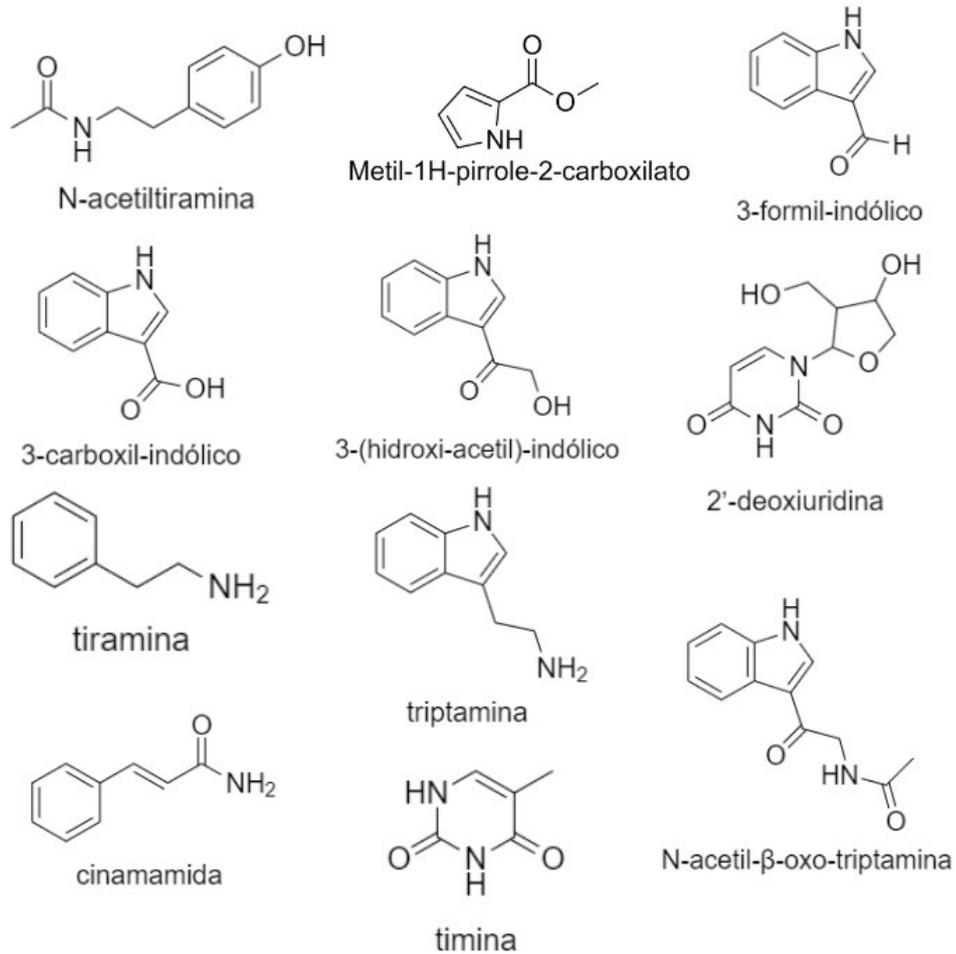


Figura 14. Nafitoquinonas identificadas em trabalhos do MicroMarin.



A figura 15 apresenta as estruturas das moléculas derivadas de aminoácidos identificadas nos trabalhos do MicroMarin.

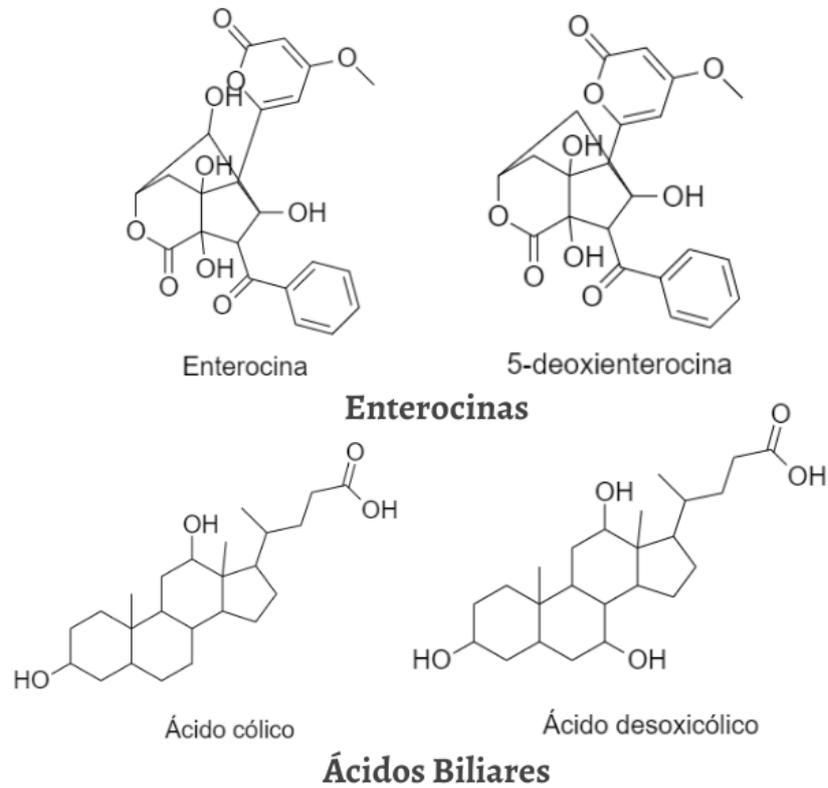
Figura 15. Bases nitrogenadas identificadas do MicroMarin.



Fonte: Autor.

A figura 16 apresenta a estrutura das enterocinas e ácidos biliares.

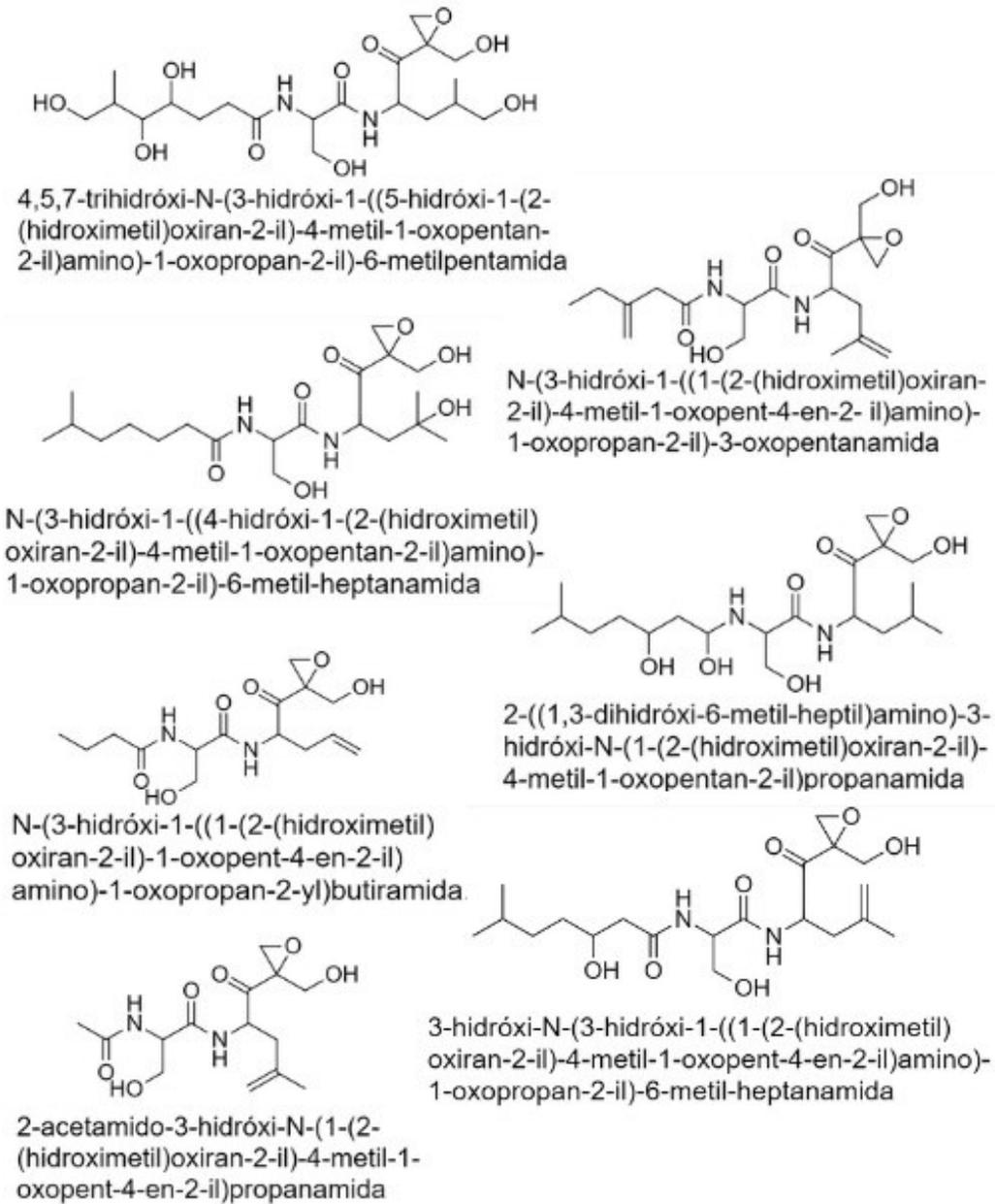
Figura 16. Estrutura das enterocinas e ácidos biliares identificados no MicroMarin.



Fonte: Autor.

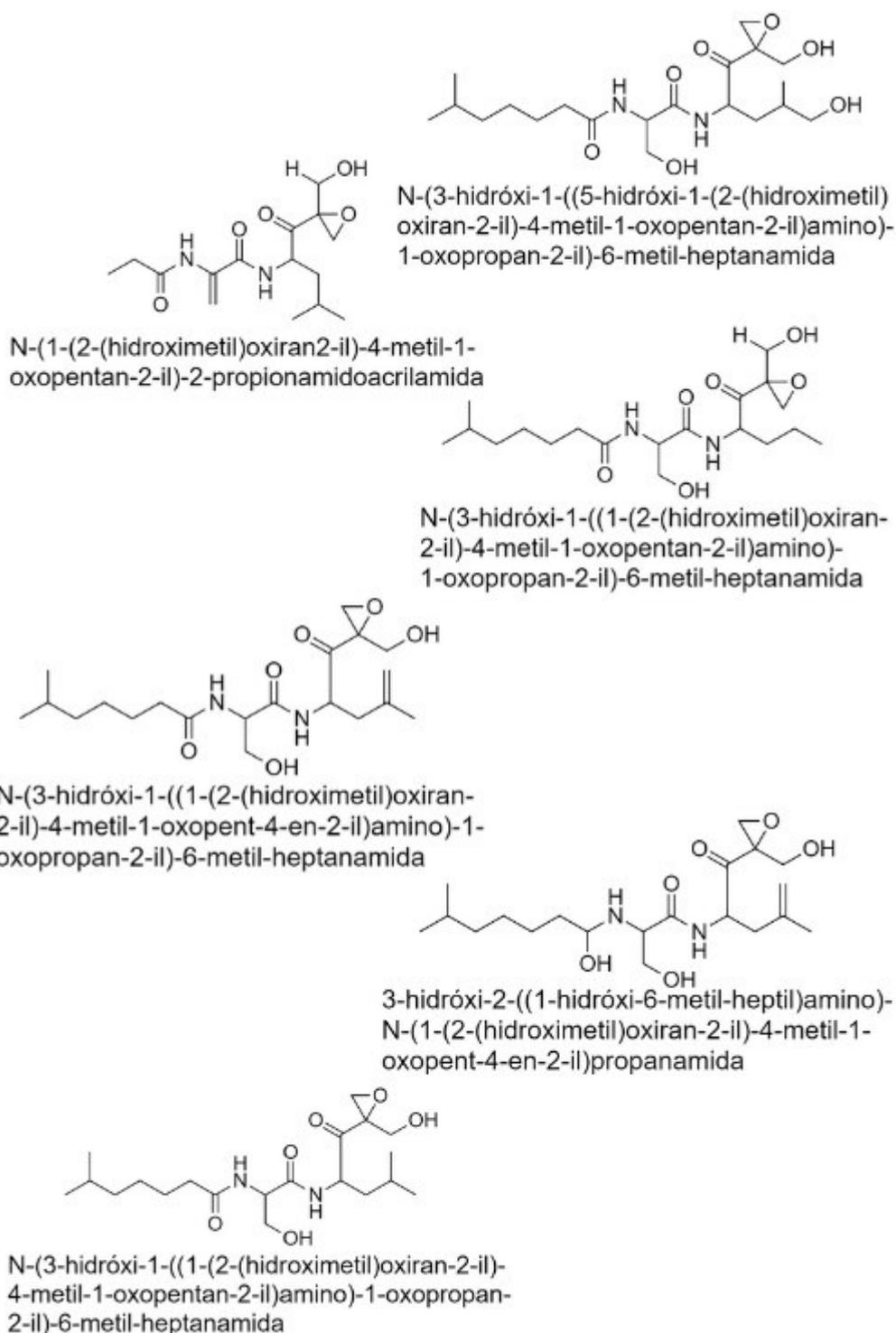
As figuras 17 e 18 apresentam as amidas identificadas em trabalhos do MicroMarin.

Figura 17. Amidas identificadas no MicroMarin. Parte 1.



Fonte: Autor.

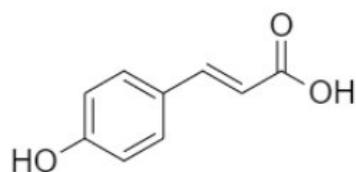
Figura 18. Amidas identificadas no MicroMarin. Parte 2.



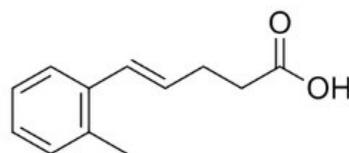
Fonte: Autor.

Por fim, a figura 19 apresenta as moléculas diversas identificadas no MicroMarin.

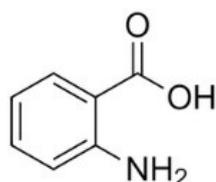
Figura 19. Moléculas de classes diversas identificadas no MicroMarin.



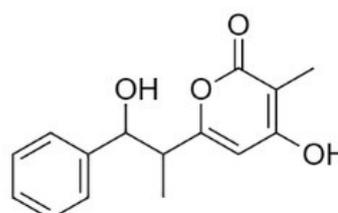
Ácido cinâmico



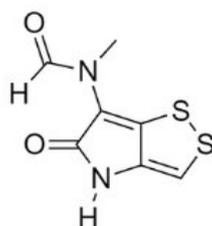
Ácido-5-2-(metilfenil)-4-pentenóico



ácido 2-aminobenzóico



4-hidróxi-6-(2-hidróxi-2-fenil-1-metil-etil)-3-metil-2H-piran2-ona

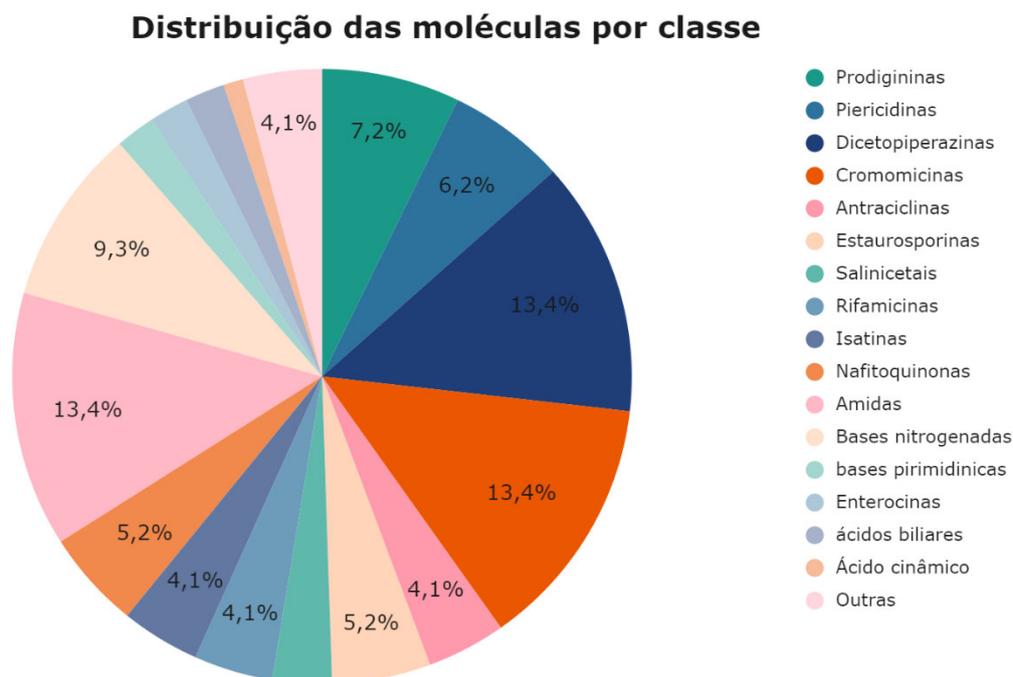


N-(4,5-dihidro-5-oxo-1,2-ditiolo[4,3-b]pirrol-6-il)-N-metil-formamida

Fonte: Autor.

A distribuição das moléculas entre as diferentes classes químicas está representada na figura 20. As classes mais representativas foram as cromomicinas e as dicetopiperazinas e as amidas, ambas com 13,4% do total de compostos. Bases nitrogenadas também foram representativas, totalizando 9,3% do total. As prodigininas representam 7,2%.

Figura 20. Distribuição das moléculas identificadas por classe química.



Fonte: Autor.

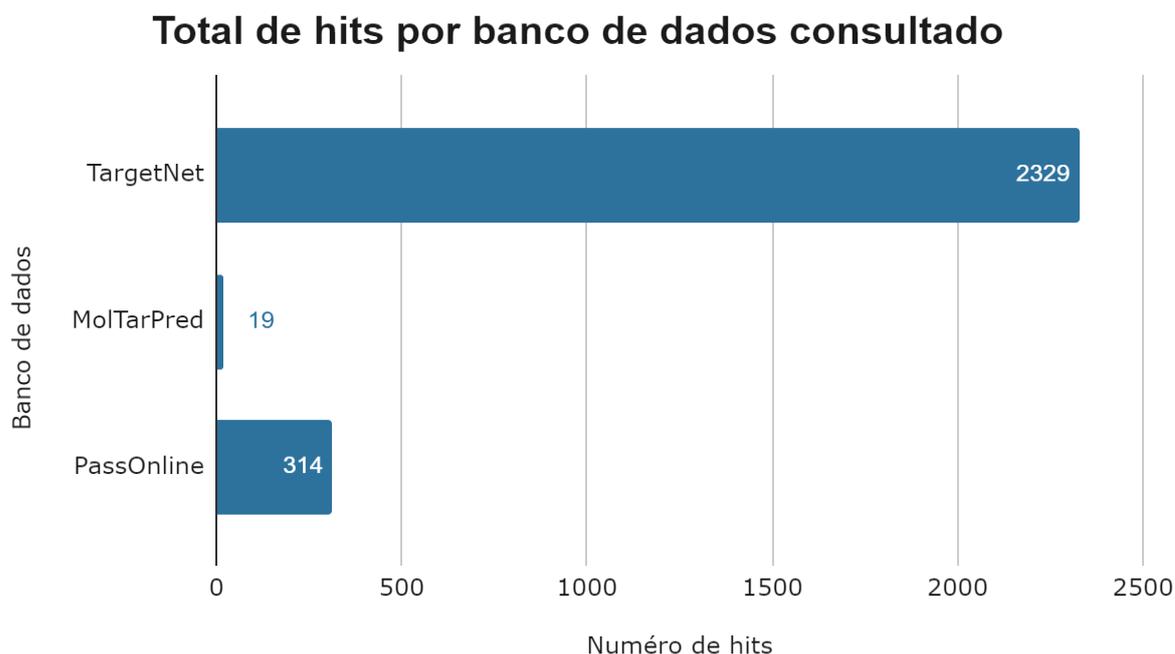
O APÊNDICE B apresenta a lista das moléculas identificadas, as cepas onde aparecem e os códigos SMILES utilizados para o *target fishing*.

4.3.4. Prospecção de possíveis alvos por *target fishing*

O APÊNDICE C deste trabalho reúne os resultados da prospecção *in silico* do potencial biotecnológico das moléculas identificadas. As moléculas foram divididas em seções agrupadas por classes químicas e cada estrutura contém os *hits* de cada uma das três plataformas utilizadas.

Utilizando um *Threshold* de 0.9 para as plataformas TargetNet e PassOnline e um valor de confiança acima de 9 para o MolTarPred, foram identificados um total de 2662 alvos nas três plataformas, considerando que um mesmo alvo pode se repetir em diferentes moléculas. A figura 21 ilustra os números de *hits* considerando cada uma das três bases de dados. O TargetNet apresentou a maior quantidade de alvos, relacionando as moléculas adicionadas com 2329 possíveis alvos moleculares; a segunda plataforma com mais resultados foi o PassOnline, com 314 *hits*. Por último, com apenas 19 resultados entre as 97 moléculas, está a plataforma MolTarPred.

Figura 21. Número de *hits* por banco de dados.

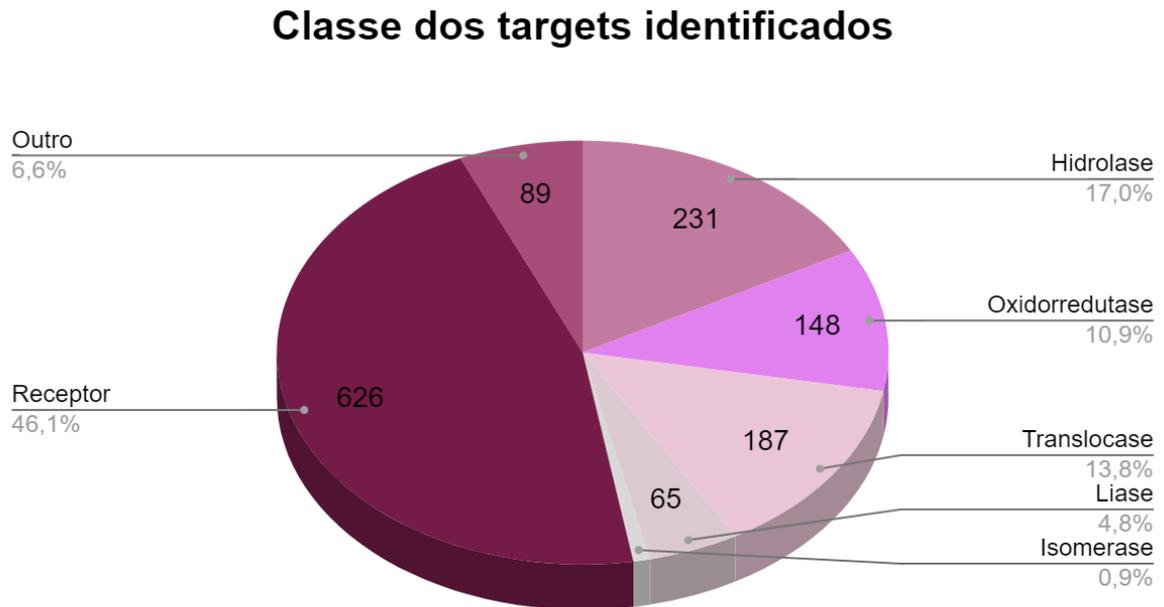


Fonte: Autor.

Uma análise mais aprofundada entre os alvos no TargetNet, permitiu a construção da figura 22, que ilustra as diferentes classes proteicas que interagiram com as moléculas do grupo. Das 1358 proteínas distintas apresentadas em nosso levantamento, 626 (46,1% do total) pertencem à classe dos receptores, 231 (17%) são hidrolases e 187 (13,8%) são translocases.

Utilizamos o TargetNet para esta caracterização por se tratar da plataforma mais representativa em nossas investigações. Dos 626 receptores identificados, 367 (58,7%) interagiram com as dicetopiperazinas. Essas moléculas também foram as mais representativas quando analisadas as interações com hidrolases: Entre os 231 *targets* identificados, 72 (31,2%) apresentaram interações com a classe. Por fim, entre as 187 translocases presentes na análise, 116 (62%) demonstraram interação com as estaurosporinas.

Figura 22. Classe proteica dos *targets* identificados na plataforma TargetNet.



Fonte: Autor.

4.4. Discussão

4.4.1. Bactérias do MicroMarin

Entre os sete táxons de bactérias identificados neste trabalho, quatro gêneros - *Actinomadura*, *Micromonospora*, *Salinispora* e *Streptomyces* - pertencem às bactérias Gram-positivas, especificamente ao grupo dos actinomicetos ou actinobactérias.

O grupo, pertencente à ordem Actinomycetales, está entre as maiores unidades taxonômicas do domínio Bacteria. Elas são, na sua maioria, organismos de vida livre, e podem ocupar uma ampla variedade de ecossistemas, terrestres e aquáticos. O grupo é considerado uma forma transicional entre bactérias e fungos, devido à capacidade de alguns de seus representantes de formarem micélios e se reproduzirem por esporulação. Apesar dessas semelhanças ecológicas, toda a morfologia celular e organização do material genético desses indivíduos é característico dos procariontes, apresentando um DNA circular disperso no citoplasma e uma parede de peptidoglicano, característico das bactérias Gram-positivas (BARKA et. al., 2015).

Os actinomicetos existem em uma grande variedade de habitats, de modo que o grupo possui uma extensa faixa de tolerância entre diversas variáveis ambientais, tais como umidade, temperatura, valores de pH, salinidade, entre outros (ZENOVA et. al., 2011). A maioria dos actinomicetos conhecidos habita nos solos, especialmente nos alcalinos, com uma faixa de pH entre 6 e 9, sendo uma parte importante da microbiota desses locais (BARKA et. al., 2015). Todavia, muitas dessas bactérias são adaptadas para a vida no ar e nos corpos aquáticos, marinhos e de água doce. Alguns actinomicetos possuem características mais extremófilas, sendo possível encontrar espécies termófilas vivendo em ambientes como a Antártica (MEVS et. al., 2000).

Alguns actinomicetos podem se associar a organismos marinhos, tanto a invertebrados como corais, esponjas e equinodermos, quanto à vertebrados como o baiacu. Essas interações podem ter sido essenciais para a evolução da produção de metabólitos secundários, importantíssimos para relações ecológicas como defesa química e competição intra e interespecíficas (JAGANNATHAN et. al., 2021). Além da interação com invertebrados marinhos sésseis, actinomicetos também podem ser encontrados no plâncton e em biofilmes (GHANEM et. al., 2000).

Dentro do contexto biotecnológico, a produção de metabólitos secundários pelos actinomicetos é extremamente explorada por diversos ramos da indústria, desde à agricultura à aplicações medicinais. O grupo é especialmente importante na produção de antibióticos, de modo que cerca de 80% desses metabólitos são produzidos por bactérias do grupo, especificamente pelo gênero *Streptomyces*, dos quais 50% dos antibióticos clinicamente relevantes foram identificados (VAN DER HEUL et. al., 2018).

Moléculas encontradas neste levantamento, como a salinosporamicina A, produzida pela cepa BRA-213, pertencente ao gênero *Salinospora*, são conhecidas pela literatura por seu potencial anticâncer. Um potente inibidor de proteassoma, a salinosporamicina A pode atuar evitando a degradação de proteínas importantes na regulação do ciclo celular, evento comum de ocorrer na desordem celular ocasionada pelas neoplasias (FELING et. al., 2003). Outras moléculas com potencial antitumoral foram identificadas de actinomicetos, tais como actinofuranonas e dicetopiperazinas como a ciclo (L-Pro-L-Met) (JAGANNATHAN et. al., 2021).

Além dos actinomicetos, o levantamento bibliográfico dos trabalhos relacionados ao MicroMarin permitiu a identificação de três outros gêneros de bactérias, todas gram negativas: *Halomonas*, *Pseudoalteromonas* e *Pseudovibrio*.

O gênero *Halomonas* é composto por bactérias estritamente aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, halofílicas ou halotolerantes. As cepas desse grupo são isoladas de ambientes marinhos, ou de águas com salinidade alta ou hipersalinas. Do ponto de vista biotecnológico, o gênero é explorado para a produção de exopolissacarídeos, emulsificantes e ainda é utilizado em processos de biorremediação (VENTOSA et. al., 2021). A literatura ainda indica que o gênero é conhecido por possuir características antibióticas e citotóxicas (DÍAZ-CÁRDENAS et. al., 2017). Mata et. al. (2016) associa a produção de exopolissacarídeos a muitas das atividades biológicas do gênero. A cepa 203 do MicroMarin é associada à bactéria *Halomonas* sp., e permitiu a identificação de dicetopiperazinas, ácidos biliares e derivados de aminoácidos.

O gênero *Pseudoalteromonas* consiste em bactérias marinhas, Gram-negativas flageladas. O grupo é conhecido pela produção de prodigininas, metabólitos secundários com coloração avermelhada conhecidos pelo potencial antibiótico, antitumoral, entre outros. O gênero também aparece na literatura como produtor de tambjamins, moléculas com coloração amarelada, semelhantes às prodigininas em estrutura. As bactérias do gênero estão geralmente associadas a organismos como algas, tunicados e esponjas, mas podem ser de vida livre (SAKAI-KAWADA et. al., 2019). A cepa BRA-007 foi identificada como uma espécie de *Pseudoalteromonas*, e está relacionada ao isolamento da molécula prodigiosina, do grupo das prodigininas.

Por fim, o gênero *Pseudovibrio* é composto por bactérias marinhas, heterotróficas, Gram-negativas e anaeróbicas facultativas (SHIEH et. al., 2004). O grupo foi notificado como produtor de prodigininas, como a heptilprodigiosina (SERTAN-DE GUZMAN et. al., 2007). Bactérias desse grupo foram identificadas tanto a partir de amostras de sedimento (cepa BRA-612) quanto associadas à ascídias do gênero *Euherdmania* (cepa BRA-342). A cepa coletada em sedimento levou à identificação da molécula de heptilprodigiosina, enquanto a bactéria associada ao tunicado levou à identificação de prodigiosina.

4.4.2. Moléculas identificadas

Todas as moléculas identificadas neste trabalho foram provenientes de extratos citotóxicos. A investigação do potencial citotoxicidade é decorrente da área de pesquisa dos laboratórios membros do MicroMarin, que buscam produtos naturais marinhos potencialmente citotóxicos para o combate a neoplasias.

De fato, grande parte das moléculas identificadas, após passarem pela investigação de *target fishing* interagem com alvos relacionados à proliferação celular, ou eram denominados como antineoplásicos pela plataforma PassOnline, que relaciona a molécula inserida com possíveis atividades biológicas. Alvos como a Caspase 9, que interagiu com as prodigininas e é responsável pela regulação dos processos de apoptose (BRETNALL et. al., 2013) apareceram durante todos os resultados.

Entre as classes identificadas, destacam-se as dicetopiperazinas, as amidas, as cromomicinas e as prodigininas. Essas classes, juntas, correspondem a quase metade de todas as estruturas identificadas neste trabalho.

As dicetopiperazinas são os derivados de aminoácidos mais comuns encontrados na natureza. Essas moléculas consistem em dois ou mais aminoácidos unidos por ligações não peptídicas. Por serem moléculas relativamente simples e estáveis, as dicetopiperazinas são vistas como potenciais para o desenvolvimento de moléculas terapêuticas. Estudos em painéis de células tumorais demonstraram que essas estruturas possuem efeitos citotóxicos (VAN DER MERWE et. al., 2008).

As amidas são compostos nitrogenados importantes dentro da química. As amidas derivadas de naftoquinonas ativas são conhecidas da literatura por apresentarem diversos potenciais biotecnológicos, desde antimicrobiano a antitumoral (JORDÃO et. al., 2013; SILVA et. al., 2020) Estudos como o de Sreelatha e colaboradores (2014) evidenciam, através de estudos em linhagens celulares HeLa e SAS e de metodologias *in silico*, o potencial citotóxico de amidas derivadas de naftoquinonas (SREELATHA et. al., 2014).

As cromomicinas, especialmente a cromomicina A3 é um conhecido antibiótico com potencial anticâncer. Essas moléculas são capazes de formar dímeros com cátions divalentes como o magnésio, ligando-se nas sequências ricas de citosinas e guaninas no DNA, impedindo sua transcrição e replicação. Devido à alta toxicidade, o produto natural não é indicado no tratamento de neoplasias (MURASE

et. al., 2018), entretanto, estudos do grupo têm indicado que algumas dessas moléculas podem ter mecanismos de morte específicos, como a cromomicina A5, que pode induzir morte celular imunogênica em melanoma metastático (FLORÊNCIO et. al., 2021) e a cromomicina A2, que induz autofagia, também em células de melanoma (GUIMARÃES et. al., 2014). O MicroMarin tem permitido a identificação/isolamento de cromomicinas, como às 13 moléculas adicionadas no levantamento deste trabalho. Moléculas aparentemente inéditas estão sendo identificadas pelo grupo.

Um fato interessante a discutir em relação às cromomicinas é que essas moléculas são conhecidas por interagir com o material genético, e não com compostos proteicos. Desse modo, os bancos de dados utilizados neste trabalho não conseguem prever alvos tradicionalmente relacionados a essas estruturas. Todavia, a pesquisas de *targets* nas bases de dados relacionaram as estruturas identificadas por nosso grupo à molécula HSP90 - alpha. Esta proteína é uma chaperona que promove a maturação, manutenção estrutural e regulação de proteínas envolvidas no controle do ciclo celular e na transdução de sinais (MITAL; RAJALA, 2020). A HSP90 – alpha está relacionada tanto a processos imunes, quanto inflamatórios, levando à secreção por monócitos de moléculas importantes para a morte celular, como o TNF, ou fator de morte tumoral (GALLUZZI et. al., 2020). O trabalho de Florêncio e colaboradores (2020), evidenciou a indução de morte celular imunogênica pela cromomicina A5, sem especificar com certeza os alvos envolvidos no processo. Na investigação deste trabalho, a cromomicina A5 pareceu interagir com a HSP-90. Investigações futuras podem determinar se este alvo é modulado pela cromomicina A5 durante o processo de morte imunogênica.

As prodigininas são conhecidas da literatura por induzir apoptose por meio da acidificação do meio intracelular. Essas moléculas atuam no simporte de H⁺/Cl⁻ através de membranas biológicas (KAWAUCHI et. al., 2008). Estudos recentes como o de Zheng et. al. (2021) também relacionam essas moléculas à deflagração de morte por autofagia. Sete moléculas da classe foram catalogadas na realização deste trabalho.

Quanto à abordagem de *target fishing*, a maioria das moléculas de uma mesma classe interagia com os mesmos *hits*, muitas vezes tendo apenas o valor estatístico alterado. Esse resultado corroborou com o esperado pela literatura, pois como Galati et. al. (2021) afirma, é esperado que moléculas com estruturas semelhantes, desenvolvam funções biológicas parecidas.

A vasta quantidade de dados obtida, mesmo com um *threshold* de 0,9 é uma das características do *target fishing* por comparação de similaridade. Nosso trabalho levantou 2662 alvos entre as 97 moléculas. Essa alta quantidade de variáveis pode levar à descoberta de falsos *targets* (GALATI et. al., 2021; MAIA et. al., 2020). A fim de diminuir a probabilidade de erros, escolhemos para a discussão no capítulo posterior apenas os *targets* que apareceram em mais de uma plataforma para a mesma molécula.

5. CAPÍTULO 2 - CARACTERIZAÇÃO E DISCUSSÃO DOS TARGETS EM DESTAQUE

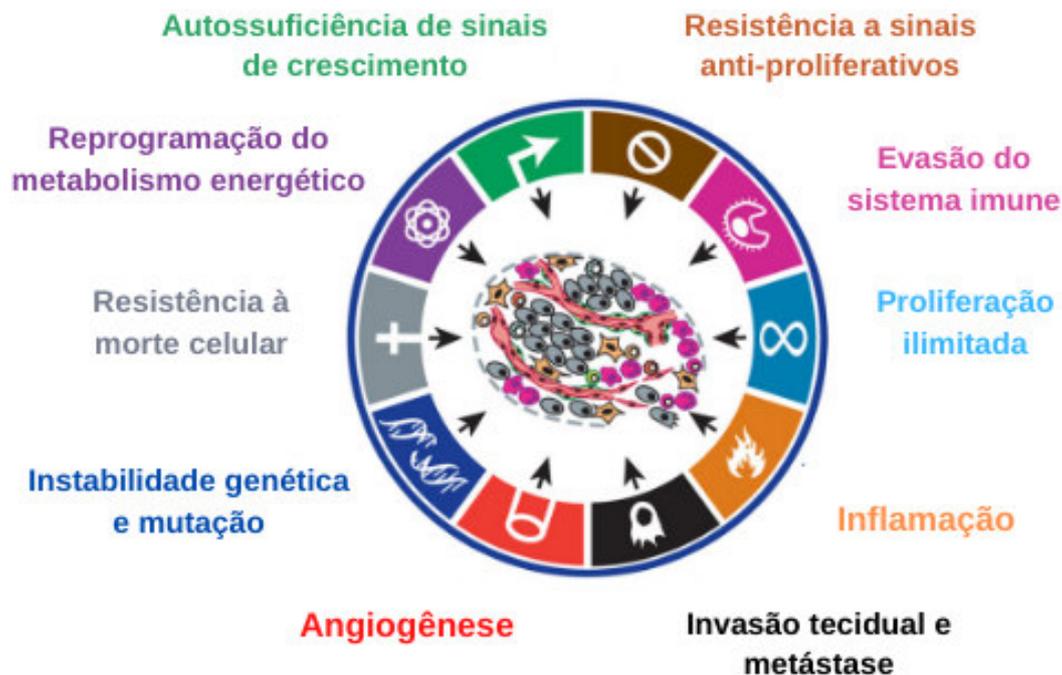
5.1. Introdução

Pode-se definir câncer com um conjunto heterogêneo de mais de 100 doenças que culminam com o crescimento desordenado de células, que podem invadir tecidos vizinhos ou se espalhar, por meio da corrente sanguínea, para órgãos distantes (INCA, 2020). O câncer pode se desenvolver em praticamente todas as partes do corpo, visto que o processo de divisão celular é natural para a maioria das células saudáveis. Células normais crescem e sofrem divisão, formando novas células quando necessárias. Ao envelhecerem ou apresentarem algum erro no desenvolvimento, elas morrem e são substituídas por outras. Quando esses mecanismos são prejudicados, células danificadas podem se proliferar, levando à formação de tumores. Enquanto tumores benignos (não considerados câncer) possuem um crescimento não invasivo, geralmente em taxas baixas e apresentam-se bem delimitados por uma cápsula fibrosa, os tumores malignos possuem natureza infiltrativa, células indiferenciadas e geralmente apresentam taxa de crescimento superior aos benignos (NCI, 2021).

Células malignas são diferentes de células saudáveis em diversos aspectos. Primeiramente, enquanto células normais necessitam de estímulos para que iniciem o processo de replicação celular, as cancerosas crescem na ausência desses sinais, e são capazes de ignorar sinais que as guiariam para a morte celular programada (apoptose) ou interrupção do ciclo celular. Células danificadas normalmente são eliminadas pelo sistema imunológico, todavia, alguns tumores são capazes de se esconder das células de defesa, ou até convencê-las a proteger o tumor ao invés de atacá-lo (NCI, 2021).

Hanahan & Weinberg (2011) determinaram as marcas registradas do câncer, com o intuito de promover um princípio organizador capaz de facilitar o entendimento da complexidade das doenças neoplásicas (figura 23). À medida que células saudáveis vão se tornando malignas, elas adquirem essas características por meio de várias etapas. Em suma, adquiri-las é essencial para que as células tumorais possam continuar crescendo, vencendo as defesas do sistema imune e colonizando tecidos e órgãos (HANAHAN & WEINBERG, 2011).

Figura 23. Marcas registradas adquiridas pelas células malignas.



Fonte: Traduzido de Hanahan & Weinberg (2011).

O câncer é considerado o principal problema de saúde pública do mundo, habitando entre as quatro principais causas de morte prematura - antes dos 70 anos de idade - na maioria dos países. A incidência tem aumentado em parte pelo aumento e envelhecimento da população, como pela mudança na distribuição e prevalência de fatores de risco associados. Ao observar as estatísticas da doença em países em desenvolvimento, é possível notar o declínio de cânceres relacionados à processos inflamatórios, ao ponto que os relacionados à hábitos associados à urbanização (alimentação inadequada, sedentarismo, entre outros) aumentam. Esses fatores de risco estão associados também a doenças cardiovasculares, outra das principais causas de mortalidade ao redor do mundo (INCA, 2020).

O triênio 2020-2022, estimativa vigente para os casos de câncer no Brasil, aponta que ocorrerão cerca de 625 mil novos casos da doença. O câncer de pele não melanoma será o mais incidente, seguido pelos de mama e próstata, cólon e reto, pulmão e estômago. A figura 24 relaciona os tipos de câncer, excetuando o de pele não melanoma, considerando o sexo dos pacientes. Indivíduos do sexo masculino sofrerão mais com cânceres de próstata, cólon e reto, pulmão, estômago e cavidade oral. Indivíduos do sexo feminino lidarão principalmente com cânceres de mama,

cólon e reto, colo do útero, pulmão e tireoide. O câncer de pele não melanoma acometerá cerca de 29,5% das pacientes femininas, enquanto a taxa em homens deverá representar 27,1% do total de neoplasias (INCA, 2020).

Figura 24. Distribuição proporcional da previsão de incidência de câncer, exceto de pele não melanoma, para o triênio 2020-2022 por sexo.

Localização primária	Casos	%			Localização primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%			Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e Reto	20.540	9,1%		Cólon e Reto	20.470	9,2%	
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.760	7,9%		Colo do útero	16.710	7,5%	
Estômago	13.360	5,9%		Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.440	5,6%	
Cavidade Oral	11.200	5,0%		Glândula Tireoide	11.950	5,4%	
Esôfago	8.690	3,9%		Estômago	7.870	3,5%	
Bexiga	7.590	3,4%		Ovário	6.650	3,0%	
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%		Corpo do útero	6.540	2,9%	
Laringe	6.470	2,9%		Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%	
Leucemias	5.920	2,6%		Sistema Nervoso Central	5.230	2,3%	

* Números arredondados para múltiplos de 10

Fonte: INCA (2020).

Os produtos naturais têm sido amplamente pesquisados como alternativas *multi-targets* para o tratamento de doenças multifatoriais. Sabendo que doenças complexas possuem grandes chances de desenvolverem mecanismos de resistência quando a perturbação se dá em apenas um alvo, os PNs podem ser alternativas viáveis para o tratamento de enfermidades como o câncer.

Na oncologia, a pesquisa por produtos naturais permitiu que a classe se tornasse responsável por cerca de 65% dos fármacos anticâncer. Fármacos como a doxorrubicina, o paclitaxel, a vincristina e a vimblastina são geralmente utilizados como primeira escolha para algumas neoplasias. Dentro da classe dos PNs, os produtos de origem marinha têm ganhado atenção nas últimas décadas. Como discutido na introdução desta monografia, as características ambientais únicas enfrentadas por organismos marinhos, permitiram a formação de uma ampla diversidade de substâncias citotóxicas, que podem ser utilizadas como forma de tratamento de cânceres (JIMENEZ et. al., 2020; PERDICARIS et. al., 2013).

A prospecção *in silico* de candidatos a moléculas anticâncer tem se tornado cada vez mais útil, a fim de economizar recursos e tempo. Diversas formas de *target fishing* podem ser aplicadas na pesquisa de alvos, entre eles a mineração de dados (do inglês *data mining*), *docking* reverso, e pesquisas de similaridade molecular, como

utilizado neste trabalho. Plataformas públicas como o PubChem e o banco de dados do NCI podem fornecer estruturas para programas de *docking* ou alimentar sites de análise de similaridade (JENKINS et. al., 2006). Exemplos como o trabalho de Chen e colaboradores (2017), que previu por *docking* reverso a ação antitumoral de produtos naturais marinhos, sinalizam que aplicações *in silico* podem ser importantes ferramentas para filtrar candidatos a abordagens experimentais ou promover o reposicionamento de drogas não aprovadas pelas agências regulatórias de medicamentos (CHEN et. al., 2017).

Este é o primeiro trabalho do grupo do MicroMarin a investigar o potencial biotecnológico das moléculas identificadas no banco por meio de ferramentas *in silico*, visto que o interesse principal das pesquisas no grupo é a investigação *in vitro* do potencial citotóxico dos extratos bacterianos, visando o isolamento e caracterização de compostos com atividade antitumoral. Moléculas em destaque nesta monografia poderão ser utilizadas em outras abordagens *in silico* e/ou novos experimentos *in vitro* a fim de melhor caracterizar seus mecanismos de ação.

5.2. Resultados

A seção de resultados do capítulo anterior apresenta os dados obtidos após o *target fishing* das moléculas sintetizadas pelas bactérias do MicroMarin. Utilizando em três plataformas distintas um *threshold* similar de 0,9, foi possível obter um vasto universo de possíveis alvos moleculares, relacionados ou não à natureza citotóxica dos extratos nos quais as moléculas foram identificadas. Para este capítulo, vamos discutir de forma mais detalhada apenas os destaques da primeira fase deste projeto. Entre as 17 classes químicas levantadas, duas obtiveram os mesmos *hits* em mais de uma plataforma de *target fishing*, as dicetopiperazinas e as estaurosporinas.

A tabela 2 relaciona as moléculas que apresentaram *hits* duplicados, suas classes químicas, os alvos moleculares com os quais interagiram e as plataformas em que as interações ocorreram. Enquanto somente duas entre as 13 dicetopiperazinas apresentaram interações com o mesmo receptor (o opióide do tipo kappa), as estaurosporinas interagiram com cinco *targets* distintos, e apresentaram algumas interseções entre as cinco moléculas identificadas, de modo que todas foram ativas em pelo menos um alvo molecular. Todos os cinco alvos identificados para as estaurosporinas são quinases, sendo três subtipos de quinases C e uma quinase

ribossomal do tipo S6. O quinto alvo molecular é um receptor do fator de crescimento epidérmico erbB1.

Tabela 2. Moléculas cujos alvos se repetiam em mais de uma plataforma de *target fishing*.

Molécula	Classe Química	Alvos	Plataformas
Ciclo (Trp-trans-Pro)	Dicetopiperazinas	Receptor opióide do tipo kappa	TargetNet e MolTarPred
Ciclo (Trp-cis-Pro)			
N-metil-estaurosporina	Estaurosporinas	Receptor do fator de crescimento epidérmico erbB1; Proteína ribossomal S6 quinase beta-1; Quinase C do tipo beta, Quinase C do tipo epsilon, Quinase C do tipo gama	TargetNet e MolTarPred (Fator erbB1); TargetNet e PassOnline (demais alvos).
N-metil-hidróxi-estaurosporina			
Estaurosporina		Proteína ribossomal S6 quinase beta-1; Quinase C do tipo beta, Quinase C do tipo epsilon, Quinase C do tipo gama	TargetNet e PassOnline
N-carboxamida-estaurosporina			
Hidróxi-estaurosporina	Proteína ribossomal S6 quinase beta-1; Quinase C do tipo beta, Quinase C do tipo epsilon		

Fonte: Autor.

Todos os alvos identificados possuem relação com o surgimento de neoplasias, e podem ser alvos potenciais para o tratamento de cânceres. Na seção seguinte, eles serão discutidos com base na literatura.

5.3. Discussão

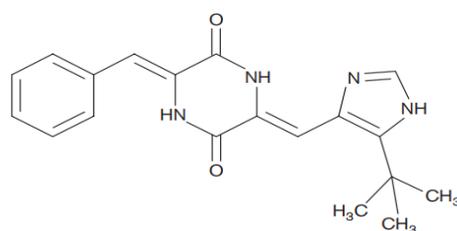
As dicetopiperazinas (DKP) são os menores peptídeos cíclicos existentes na natureza, e são formadas pela reação de condensação de dois alfa-aminoácidos. Essa reação é catalisada por duas enzimas principais, a não-ribossomal peptídeo sintetase (NRPS) e a ciclopeptídeo sintetase. Quando comparadas com os peptídeos lineares, as DKPs exibem uma maior estabilidade enzimática e rigidez molecular. Zhao et. al. (2020) discute que o anel 2,5 dicetopiperazina, estrutura base do grupo, apresenta muitos locais que permitem a formação de ligações de hidrogênio, incluindo tanto sítios aceptores, quanto doadores. O autor ainda discute que as ligações de hidrogênio são uma das interações intermoleculares mais importante na relação entre fármacos e seus alvos moleculares, visto que são ligações fortes, mas temporárias (SONG et. al., 2021; ZHAO et. al., 2020).

Na natureza, essa classe de moléculas é produzida por bactérias para a realização de *quórum sensing*. Esses processos visam a comunicação celular entre os microrganismos, a fim de responder metabolicamente às condições ambientais oscilantes (ZHU et. al., 2019). As moléculas sinalizadoras liberadas pelas células nesse processo podem ser denominadas de autoindutores. Em situações desfavoráveis, quando a concentração de autoindutores atinge um patamar crítico, podem levar à regulação da expressão gênica nessa população, fazendo com que os diversos organismos se comportem como um superindivíduo (ZHU et. al., 2019).

As características químicas, e a disponibilidade das moléculas de DKPs permitiram que as estruturas tenham sido bastante estudadas ao redor do mundo, de modo que até agosto de 2012, cerca de 150 patentes globais estavam relacionadas à classe química e seus derivados sintéticos. Embora as DKPs sejam globalmente pesquisadas, existem poucas revisões sintetizando as descobertas científicas dos compostos, a menos quando relacionados a nichos específicos. Por exemplo, a última revisão sobre o grupo é da autoria de Song e colaboradores (2021), e o artigo se atenta a discutir as DKPs provenientes dos ecossistemas marinhos. Haja vista que os trabalhos de nosso grupo de pesquisa possuem justamente o foco de prospecção de produtos naturais provenientes do mar, esta revisão permitiu um vasto entendimento das DKPs. (APOSTOLOPOULOS et. al., 2021; SONG et. al., 2021; WANG et. al., 2013).

As DKPs possuem um amplo espectro de atividades biológicas, desde moléculas antivirais, antimicrobianas, anti-inflamatórias, antiplasmidiais e antitumorais (BHATTACHARYA et. al., 2019; BUEDENBENDER et. al., 2016; OU et. al., 2016). Dentro do recorte do potencial anticâncer, podemos citar a plinabulina (Figura 25), um fármaco com potencial neoplásico em processo de aprovação pelas agências reguladoras. A molécula, derivada de uma dicetopiperazina isolada do fungo *Aspergillus* sp., é um potente agente despolimerizador de microtúbulos, apresentando ótimos resultados de citotoxicidade em diversas linhagens tumorais, desde câncer de cólon em camundongos, à carcinomas de pulmão humano. Estudos recentes também apontam que a molécula pode atuar na polarização de macrófagos, fazendo com que monócitos tendam a se diferenciar em macrófagos do tipo M1, considerados um fenótipo com características antitumorais. A polarização desses macrófagos pode culminar com a regressão do tumor por meio de processos imunológicos (NATOLI et. al., 2021; NICHOLSON et. al., 2006; SONG et. al., 2021; ZHAO et. al., 2020).

Figura 25. Estrutura da Plinabulina (NPI-2358).



Fonte: Nicholson (2006). A plinabulina é um derivado da dicetopiperazina NPI-2350 com bons resultados em pesquisas anticâncer. A molécula está na fase III dos testes clínicos e tem sido estudada tanto em monoterapia, quanto combinada a outros produtos naturais.

Quanto à diversidade de organismos marinhos capazes de sintetizar DKPs, podemos diversos gêneros de bactérias e fungos marinhos, de vida livre ou associados a esponjas, algas, tunicados, entre outros (SONG et. al., 2021). Grupos como os dos actinomicetos, e fungos como os dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são alguns dos representantes produtores (WEI et. al., 2020; YU et. al., 2017). As dicetopiperazinas produzidas pelas bactérias do MicroMarin foram sintetizadas por cepas de actinomicetos dos gêneros *Streptomyces* (BRA-016, BRA-060, BRA-199 e BRA-399) e *Salinospora* (BRA-213) e pela bactéria Gram-negativa *Halomonas* sp. (BRA-203). Algumas cepas que produziram DKPs não foram identificadas, mas apresentaram características de actinobactérias. Quanto à natureza das bactérias,

algumas das cepas foram isoladas de sedimentos, enquanto outras estavam associadas aos corais das espécies *Palythoa caribaeorum* e *Palythoa variabilis*.

As dicetopiperazinas Ciclo (Trp-trans-Pro) e Ciclo (Trp-cis-Pro) apresentaram interações *in silico* com a proteína receptor opioide do tipo kappa. Esse receptor é um peptídeo membranar acoplada à proteína G, que desempenha funções relacionadas à percepção da dor e pode também desempenhar papéis relacionados à excitação e regulação de funções autonômicas e neuroendócrinas. Ao interagir com o ligante endógeno ou alguns opióides sintéticos, tem sua conformação alterada e desencadeia processos de sinalização via proteína G, modulando a atuação de efetores à jusante, como à Adenilato ciclase, inibida pela ação do receptor opioide kappa ativado. A inibição da adenilato ciclase, por sua vez, inibe a liberação de neurotransmissores, reduzindo as correntes de íons de cálcio e aumentando a condutância de íons de potássio (WU et. al., 2012).

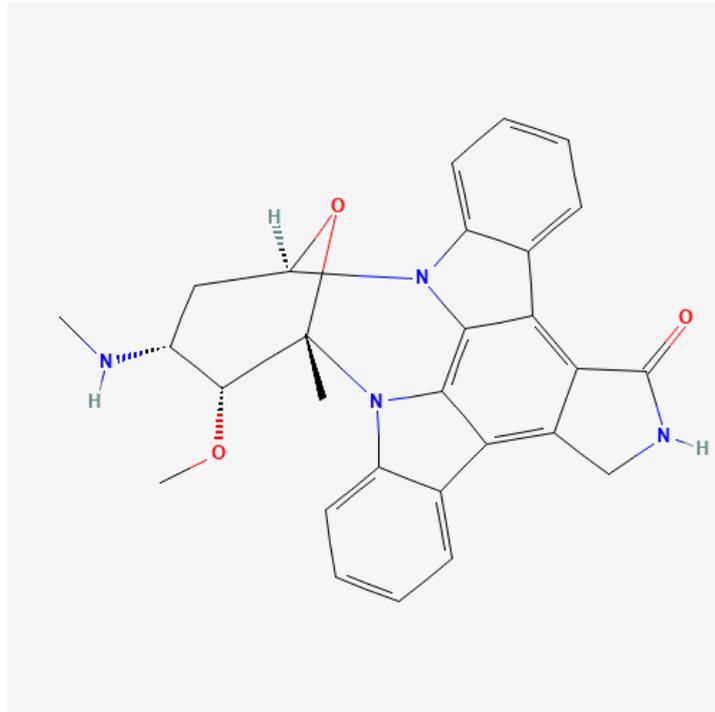
Sob uma perspectiva anticâncer, além de serem utilizados na clínica para aliviar a dor de pacientes internados com cânceres como de pulmão, colorretal e de mama (ZHOU et. al., 2021), estudos recentes apontam que os opióides podem promover a proliferação, migração, invasão e angiogênese em culturas de células tumorais e modelos animais em estudos *in vivo* (ORRIACH et. al, 2020; USTUN, 2010). Esses estudos podem parecer contraditórios, uma vez que enquanto alguns apresentam que opióides como a morfina podem aumentar a progressão de neoplasias, outros afirmam que essas moléculas podem desempenhar um papel inibitório na progressão dessas doenças (GONG et. al., 2020; ORRIACH et. al., 2020). Inibidores ou promotores da proliferação de células malignas, a presença de opióides e seus receptores em células tumorais, com diferentes níveis de expressão, a depender do tipo de tumor avaliado, foram amplamente divulgadas na literatura, como nos estudos de Chatikhine et. al. (1994) investigando câncer de mama, Zagon, Hytrek e Mclaughlin (1996) em câncer de cólon, Hatzoglou et. al.(1995) com câncer de endométrio e Lennon et. al. (2012), que apontou a superexpressão de receptores opióides em câncer de pulmão.

Apesar de ser expresso principalmente em células nervosas, o receptor opioide do tipo kappa está presente em células do coração, renais, da medula adrenal, no trato digestivo, na placenta e em células de defesa, como linfócitos T e macrófagos (MACHELSKA; CELIK, 2020; SIMONIN et. al., 1995). A diversidade de tipos celulares distintos que expressam esses receptores, e a diferença na expressão nos diversos

tipos de câncer podem permitir o uso de moléculas que interagem com receptores opióides, a depender do câncer diagnosticado. De todo modo, os receptores do tipo kappa têm emergido na pesquisa de antineoplásicos como um alvo de interesse terapêutico, devido à quantidade de atividades biológicas relacionadas aos receptores, desde respostas imunes e inflamatórias à percepção da dor e aplicações antitumorais (SHI et. al., 2021; ZHOU et. al., 2021). Outras abordagens *in silico* podem ser utilizadas para investigar a relação entre as dicetopiperazinas identificadas em nosso trabalho e o receptor opióide, entre elas, o *Docking* molecular. Pesquisas *in vitro* também podem ser realizadas posteriormente.

As estaurosporinas pertencem à classe dos alcalóides indolocarbazóis. Essas moléculas são compostos heterocíclicos que apresentam nitrogênio em sua estrutura e possuem inúmeros estudos recentes investigando seu potencial de ação em diversas aplicações, tais como antitumoral, antiviral e antibacteriano (JANOSIK et. al., 2018). O primeiro registro de isolamento da estaurosporina (Figura 26) remete ao gênero *Streptomyces staurosporeus* e tem a autoria de Omura e colaboradores (1977). A molécula é um conhecido inibidor de proteínas quinases, especialmente de tirosinas-quinases, sendo potente, mas não específica. A molécula é extremamente hidrofóbica, e possui sua estrutura derivada de duas moléculas de triptofano, com sua região polar derivada de moléculas de glicose e metionina (OMURA; ASAMI; CRUMP, 2018). A interação da estaurosporina com as proteínas quinases torna a molécula um típico agente apoptótico, de modo que tanto a molécula original, quanto produtos naturais derivados são estudados buscando aplicações na terapia anticâncer (MALSY et. al., 2019).

Figura 26. Estrutura da estaurosporina.



Fonte: PubChem.

Derivados da estaurosporina que apareceram nos trabalhos do grupo também já foram caracterizados na literatura como princípios anticâncer ativos. A hidróxi-estaurosporina, no trabalho de Lien et. al. (2017), induziu mecanismos de resposta a dano no DNA e autofagia na linhagem de osteosarcoma U2-OS. Proteínas relacionadas aos mecanismos de resposta a dano no DNA, como a ATM serina/treonina quinase pertence à superfamília das quinases e diante de um dano ao material genético, sinaliza para a parada do ciclo celular e promoção do reparo da dupla fita (ECKARDT, 2003).

A proteína quinase ribossomal S6 é uma serina/treonina quinase que compõe a subunidade ribossomal 40S e é uma das quinases melhores caracterizadas da totalidade de efetores ribossomais. A proteína está relacionada ao controle da proliferação celular e sobrevivência da célula (ZHANG et. al., 2019). Em sua forma fosforilada, liga-se, em uma de suas subunidades, à proteína pró apoptótica BAD, inibindo sua atividade. Estudos recentes apontam que a superexpressão da S6 quinase pode contar como um fator para prognóstico de diversos cânceres, e pode ser um importante alvo para o combate à neoplasias (BAHRAMI et. al., 2014; OCANA et. al., 2014; WIESWEG et. al., 2018).

As proteínas quinases C (PKCs) também pertencem ao grupo das serina/treonina quinases e sua estrutura é evolutivamente conservada entre os diversos filos de seres vivos. As funções biológicas desempenhadas por este grupo têm sido amplamente investigadas, tanto em condições fisiológicas normais, quanto em situações patológicas. Sabe-se que as PKCs possuem um papel importante na regulação dos processos de expressão de genes, progressão do ciclo celular, proliferação, migração e diferenciação celular e nos processos de apoptose (ISAKOV, 2018; NISHIZUKA, 1984). Condições patológicas como diabetes, Alzheimer e Parkinson, doenças inflamatórias e alérgicas e doenças autoimunes podem ser decorrentes de alterações ou ausência de PKCs (CHENG et. al., 2012; ISAKOV, 2018; MIYAMOTO et. al., 2002). A pesquisa de linhagens tumorais identificou a expressão aumentada de algumas isoformas de PKCs em células malignas de câncer de pulmão, mama, ovários, cérebro e rins. Por ser uma característica comum a diversos tipos de câncer, é possível que as PKCs desenvolvam um papel importante na transformação de células saudáveis em malignas. Isakov (2018) discorre que, devido ao papel importante dessas quinases na manutenção da homeostase, é possível que alterações na proporção normal dessas proteínas possam contribuir para a evolução das neoplasias.

Um dos subtipos mais estudados na oncogênese é o epsilon. Bae e colaboradores (2007) apontam que essa PKC é expressa em altas quantidades na maioria dos cânceres de pulmão de células não pequenas em seu estágio inicial. Essa superexpressão da PKC epsilon culmina com o aumento do crescimento celular ancoragem-independente e o aumento da taxa de divisão celular, quando comparadas às células sem expressão exagerada (BAE et. al., 2007). É sabido que este subtipo também está relacionado à regulação da apoptose, interagindo com moléculas como o Fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa). Acredita-se também que a quinase interage impedindo vias mitocondriais que culminam com a apoptose. Estudos como o de Gillespie et. al. (2005) identificaram que células de melanoma com baixa expressão de PKC epsilon eram mais suscetíveis à morte induzida pela citocina TRAIL do que às que apresentavam uma superexpressão. Células tumorais que superexpressão a quinase também possuem mais probabilidade de sofrer metástases (ISAKOV, 2018).

Outra isoforma presente nos resultados deste trabalho foi a PKC do tipo beta. O subtipo também tem sido relacionado à progressão de cânceres como o de

mama, cólon e próstata. O subtipo também parece estar relacionado a processos de angiogênese. O subtipo gamma, que também parece interagir com as estaurosporinas, possui estudos apontando sua participação indireta na motilidade das células tumorais e formação de metástases (YANG et. al., 2014). As estaurosporinas são consideradas moléculas que competem com o ATP no sítio de ligação das quinases C, evitando a ativação dessas moléculas. Apesar da inibição potente, em concentrações de nanomolar, essas pequenas moléculas também interagem com todos os outros tipos de serina/treonina quinases, sendo pouco específicas (KARAMAN, 2008).

Por fim, o último alvo identificado no *target fishing* para as estaurosporinas foi o receptor epidermal do fator de crescimento erbB1. O receptor pertence à família das tirosinas-quinases e possuem uma porção extracelular glicosilada, uma porção transmembrana hidrofóbica e uma porção intracelular, próxima à membrana que possui o domínio quinase, além de uma cauda carboxiterminal (ROSKOSKI, 2014). Esses receptores são expressos em células epiteliais, mesenquimais e neuronais. O receptor ERBB1, semelhante às outras quinases, desempenha papéis importantes relacionados à proliferação e manutenção do ciclo celular, e está relacionado aos cânceres como o de pulmão. Herbst et. al. (2008) aponta que a superexpressão desses receptores ocorre em cerca de 60% dos cânceres de pulmão de células não pequenas, e que até 40% do total de amostras possui receptores mutados. Por pertencer à família das tirosinas quinases, a interação do receptor do fator de crescimento com as estaurosporinas foi esperada.

A análise dos receptores e moléculas na literatura permitiu constatar que as mesmas moléculas, ou estruturas semelhantes às identificadas nos trabalhos do grupo apresentaram interações com os alvos identificados em pesquisas *in vitro*. Haja vista que nossa análise de *target fishing* se baseou na metodologia de busca por afinidade, é possível que os *targets* encontrados sejam de fatos verdadeiros. Para aumentar a certeza dessa afirmação, é necessário o emprego de outras abordagens *in silico* ou *in vivo*, como a utilização de docking molecular ou de procedimentos experimentais como cromatografias de afinidade (GALATI et. al., 2021; ZIEGLER et. al., 2013). Devido aos achados promissores neste trabalho, estudos posteriores poderão ser realizados utilizando metodologias *in silico*, como o *docking* molecular, a fim de prover mais certezas à investigação dos *targets*, ou pré-clínicos, *in vitro* ou *in vivo*, para confirmar a participação dos alvos identificados e sua possível relação com

o mecanismo de ação das moléculas. Estudos posteriores também podem investigar outros alvos, como ácidos nucleicos, através de *target fishing* não discutidos neste trabalho.

6. CONCLUSÃO

A catalogação das cepas de bactérias marinhas e moléculas oriundas de extratos com atividade citotóxica contra células tumorais permitiu a atualização dos dados do MicroMarin e a descrição do perfil químico de metabólitos secundários de extratos bacterias. A triagem *in silico* de possíveis alvos moleculares proteicos para as moléculas identificadas de cepas de bactérias marinhas do MicroMarin incrementou o potencial biotecnológico do inventário. Alvos relacionados aos processos de proliferação e morte celular foram identificados na maioria das classes químicas identificadas, em concordância com o perfil citotóxico dos extratos de onde foram isoladas.

REFERÊNCIAS

- ALMASRI, Ihab M.. Exploring polypharmacology of some natural products using similarity search target fishing approach. **International Journal Of Computational Biology And Drug Design**, [S.L.], v. 11, n. 4, p. 295, 2018. Inderscience Publishers. <http://dx.doi.org/10.1504/ijcbdd.2018.096126>.
- ABREU, Paula Araújo de. **Mecanismos envolvidos na citotoxicidade de uma ditiolpirrolona obtida de Streptomyces sp. isolado da Ascídia Eudistoma vannamei**. 2013. 99 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.
- ANIGHORO, Andrew; BAJORATH, Jürgen; RASTELLI, Giulio. Polypharmacology: challenges and opportunities in drug discovery. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 57, n. 19, p. 7874-7887, 25 jun. 2014. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jm5006463>.
- APOSTOLOPOULOS, Vasso *et al.* A Global Review on Short Peptides: frontiers and perspectives. **Molecules**, [S.L.], v. 26, n. 2, p. 430, 15 jan. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules26020430>.
- ARTHAUD, Isabelle D. B. *et al.* Studies on the Secondary Metabolites of a Pseudoalteromonas sp. Isolated from Sediments Collected at the Northeastern Coast of Brazil. **Chemistry & Biodiversity**, [S.L.], v. 9, n. 2, p. 418-427, fev. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cbdv.201100092>.
- BAE, Kyung-Mi *et al.* Protein Kinase C ϵ Is Overexpressed in Primary Human Non-Small Cell Lung Cancers and Functionally Required for Proliferation of Non-Small Cell Lung Cancer Cells in a p21/Cip1-Dependent Manner. **Cancer Research**, [S.L.], v. 67, n. 13, p. 6053-6063, 1 jul. 2007. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-06-4037>.
- BAHRAMI-B, Farnaz *et al.* P70 Ribosomal protein S6 kinase (Rps6kb1): an update. **Journal Of Clinical Pathology**, [S.L.], v. 67, n. 12, p. 1019-1025, 6 ago. 2014. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/jclinpath-2014-202560>.
- BARBOSA, Maria Leticia de Castro. Multifactorial Diseases and the Challenges in the Design of Multi-target Drugs: the contribution of the laboratory of evaluation and synthesis of bioactive substances - lassbio®. **Revista Virtual de Química**, [S.L.], v. 7, n. 2, p. 576-593, 30 dez. 2014. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.5935/1984-6835.20150025>. Disponível em: <http://static.sites.sbq.org.br/rvq.sbq.org.br/pdf/v7n2a05.pdf>.. Acesso em: 10 jan. 2022.
- BARKA, Essaid Ait *et al.* Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, [S.L.], v. 80, n. 1, p. 1-43, mar. 2016. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/mnbr.00019-15>.

BHATTACHARYA, Dhruva *et al.* Structural elucidation and antimicrobial activity of a diketopiperazine isolated from a *Bacillus* sp. associated with the marine sponge *Spongia officinalis*. **Natural Product Research**, [S.L.], v. 35, n. 14, p. 2315-2323, 4 out. 2019. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2019.1672684>.

BUEDENBENDER, Larissa *et al.* Naseseazine C, a new anti-plasmodial dimeric diketopiperazine from a marine sediment derived *Streptomyces* sp. **Tetrahedron Letters**, [S.L.], v. 57, n. 52, p. 5893-5895, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetlet.2016.11.071>.

CHATIKHINE, V.A. *et al.* Expression of opioid peptides in cells and stroma of human breast cancer and adenofibromas. **Cancer Letters**, [S.L.], v. 77, n. 1, p. 51-56, fev. 1994. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0304-3835\(94\)90347-6](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3835(94)90347-6).

CHAUDHARI, Rajan *et al.* Computational polypharmacology: a new paradigm for drug discovery. **Expert Opinion On Drug Discovery**, [S.L.], v. 12, n. 3, p. 279-291, 23 jan. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/17460441.2017.1280024>.

Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7241838/>. Acesso em: 12 jan. 2022.

CHEN, Fangling; WANG, Zhuoya; WANG, Chaoyi; XU, Qingliang; LIANG, Jiazhen; XU, Ximing; YANG, Jinbo; WANG, Changyun; JIANG, Tao; YU, Rilei. Application of reverse docking for target prediction of marine compounds with anti-tumor activity. **Journal Of Molecular Graphics And Modelling**, [S.L.], v. 77, p. 372-377, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmgm.2017.09.015>.

CHENG, An-Sheng *et al.* Scopoletin attenuates allergy by inhibiting Th2 cytokines production in EL-4 T cells. **Food & Function**, [S.L.], v. 3, n. 8, p. 886, 2012. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c2fo30054k>.

COSTANTINO, Luca; BARLOCCO, Daniela. Challenges in the design of multitarget drugs against multifactorial pathologies: a new life for medicinal chemistry? **Future Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 5-7, jan. 2013. Future Science Ltd. <http://dx.doi.org/10.4155/fmc.12.193>. Disponível em:

<https://www.future-science.com/doi/pdf/10.4155/fmc.12.193>. Acesso em: 10 jan. 2022.

DÍAZ-CÁRDENAS, Carolina *et al.* Microbial diversity of saline environments: searching for cytotoxic activities. **Amb Express**, [S.L.], v. 7, n. 1, dez. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13568-017-0527-6>.

ECKARDT, Nancy A. ATM to the Rescue. **The Plant Cell**, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 1-3, jan. 2003. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.150110>.

ELRAYESS, Ranwa A.; EL-HAK, Heba N. Gad. Anticancer Natural Products: a review. **Cancer Studies And Molecular Medicine – Open Journal**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 11-22, 29 out. 2019. Openventio Publishers. <http://dx.doi.org/10.17140/csmmoj-5-127>.

HERBST, Roy S. *et al.* Lung Cancer. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 359, n. 13, p. 1367-1380, 25 set. 2008. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmra0802714>.

ESTADOS UNIDOS. Food And Drug Administration. Food And Drug Administration. **Development & Approval Process | Drugs**. 2019. Disponível em: fda.gov/drugs/development-approval-process-drugs. Acesso em: 20 jan. 2022.

ESTIMATIVA 2020. **Instituto Nacional do Câncer**, 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/estimativa>. Acesso em: 20 de janeiro de 2022.

FELING, Robert H. *et al.* Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus salinospora. **Angewandte Chemie International Edition**, [S.L.], v. 42, n. 3, p. 355-357, 20 jan. 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/anie.200390115>.

FERREIRA, Elthon Gois. **Diversidade e potencial biotecnológico de actinomicetos recuperados do sedimento marinho coletado no arquipélago São Pedro e São Paulo, Brasil**. 2014. 158 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, Instituto de Ciências do Mar - Labomar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

FERREIRA, Elthon G. *et al.* Prospecting Anticancer Compounds in Actinomycetes Recovered from the Sediments of Saint Peter and Saint Paul's Archipelago, Brazil. **Chemistry & Biodiversity**, [S.L.], v. 13, n. 9, p. 1149-1157, set. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cbdv.201500514>.

FILIMONOV, D. A. *et al.* Prediction of the Biological Activity Spectra of Organic Compounds Using the Pass Online Web Resource. **Chemistry Of Heterocyclic Compounds**, [S.L.], v. 50, n. 3, p. 444-457, 28 maio 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10593-014-1496-1>.

FLORENCIO, Katharine Gurgel Dias. **Piercidina A1 de Streptomyces SP. recuperada de sedimento do arquipélago Fernando de Noronha altera fenótipo de células tumorais**. 2017. 100 f. Dissertação (Doutorado) - Curso de Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

FLORENCIO, Katharine G. D. *et al.* Chromomycin A5 induces bonafide immunogenic cell death in metastatic melanoma. **Biorxiv**, [S.L.], 20 set. 2021. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/2021.09.18.460876>.

FURTADO, Luciana Costa. **Prospecção de compostos com potencial anticâncer obtidos de bactérias recuperadas de ascídias da praia da Taíba-CE**. 2017. 66 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

FURTADO, Luciana C. *et al.* Marine Streptomyces sp. Isolated From the Brazilian Endemic Tunicate Euherdmania sp. Produces Dihydroeponemycin and Analogs With

Potent Antiglioma Activity. **Frontiers In Marine Science**, [S.L.], v. 8. 3 maio 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmars.2021.644730>.

GALATI, Salvatore *et al.* Recent Advances in In Silico Target Fishing. **Molecules**, [S.L.], v. 26, n. 17, p. 1-18, 24 ago. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules26175124>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/17/5124>. Acesso em: 20 dez. 2021.

GALLUZZI, Lorenzo *et al.* Consensus guidelines for the definition, detection and interpretation of immunogenic cell death. **Journal For Immunotherapy Of Cancer**, [S.L.], v. 8, n. 1, mar. 2020. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/jitc-2019-000337>.

GHANEM, Nevine B. *et al.* Isolation and enumeration of marine actinomycetes from seawater and sediments in Alexandria. **The Journal Of General And Applied Microbiology**, [S.L.], v. 46, n. 3, p. 105-111, 2000. Microbiology Research Foundation. <http://dx.doi.org/10.2323/jgam.46.105>.

GILLESPIE, Susan *et al.* Variable expression of protein kinase C ϵ in human melanoma cells regulates sensitivity to TRAIL-induced apoptosis. **Molecular Cancer Therapeutics**, [S.L.], v. 4, n. 4, p. 668-676, abr. 2005. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1535-7163.mct-04-0332>.

GONG, Shengkai *et al.* Fentanyl Inhibits Lung Cancer Viability and Invasion via Upregulation of miR-331-3p and Repression of HDAC5. **Oncotargets And Therapy**, [S.L.], v. 13, p. 13131-13141, dez. 2020. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.2147/ott.s281095>.

GUIMARÃES, Larissa *et al.* Chromomycin A2 Induces Autophagy in Melanoma Cells. **Marine Drugs**, [S.L.], v. 12, n. 12, p. 5839-5855, 4 dez. 2014. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/md12125839>.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A.. Hallmarks of Cancer: the next generation. **Cell**, [S.L.], v. 144, n. 5, p. 646-674, mar. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.

HATZOGLOU, A. *et al.* Identification and characterization of opioid-binding sites present in the Ishikawa human endometrial adenocarcinoma cell line. **The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [S.L.], v. 80, n. 2, p. 418-423, fev. 1995. The Endocrine Society. <http://dx.doi.org/10.1210/jcem.80.2.7852499>.

HUG, Joachim J.; , Daniel; MÜLLER, Rolf. Bacteria as genetically programmable producers of bioactive natural products. **Nature Reviews Chemistry**, [S.L.], v. 4, n. 4, p. 172-193, 23 mar. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41570-020-0176-1>.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Amazônia Legal**. Brasília: IBGE, 2020. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/geociencias/cartas-e-mapas/mapas-regionais/15819-ama-zonia-legal.html?=&t=o-que-e>. Acesso em 25 jan. 2022.

ISAKOV, Noah. Protein kinase C (PKC) isoforms in cancer, tumor promotion and tumor suppression. **Seminars In Cancer Biology**, [S.L.], v. 48, p. 36-52, fev. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.04.012>.

JAGANNATHAN, Sveta V. *et al.* Marine Actinomycetes, New Sources of Biotechnological Products. **Marine Drugs**, [S.L.], v. 19, n. 7, p. 365, 25 jun. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/md19070365>.

JALENCAS, Xavier; MESTRES, Jordi. On the origins of drug polypharmacology. **Medchemcomm**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 80-87, 2012. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c2md20242e>.

JANOSIK, Tomasz *et al.* Chemistry and Properties of Indolocarbazoles. **Chemical Reviews**, [S.L.], v. 118, n. 18, p. 9058-9128, 7 set. 2018. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00186>.

JENKINS, Jeremy L. *et al.* In silico target fishing: predicting biological targets from chemical structure. **Drug Discovery Today: Technologies**, [S.L.], v. 3, n. 4, p. 413-421, dez. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ddtec.2006.12.008>.

JIMENEZ, Paula C. *et al.* Enriching cancer pharmacology with drugs of marine origin. **British Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 177, n. 1, p. 3-27, 23 dez. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/bph.14876>.

JORDÃO, Alessandro K.; ROCHA, David R. da; FERREIRA, Vitor F.. Synthesis of New N,O-Acetals 2-Amino-1,4-naphthoquinones Derivatives Under Microwave Irradiation. **Proceedings Of The 14Th Brazilian Meeting On Organic Synthesis Proceedings**, [S.L.], v. 1, n. 1, set. 2013. Editora Edgard Blücher. <http://dx.doi.org/10.5151/chempro-14bmos-r0062-1>.

KARAMAN, Mazen W *et al.* A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. **Nature Biotechnology**, [S.L.], v. 26, n. 1, p. 127-132, jan. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1358>.

KATZUNG, Bertram G.; TREVOR, Anthony J. (Orgs.). **Farmacologia básica e clínica**. 13 ed. Porto Alegre: McGraw-Hill, 2017. 1202 p.

KAWAUCHI, Keiko *et al.* Cycloprodigosin Hydrochloride Activates the Ras-PI3K-Akt Pathway and Suppresses Protein Synthesis Inhibition-Induced Apoptosis in PC12 Cells. **Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry**, [S.L.], v. 72, n. 6, p. 1564-1570, 23 jun. 2008. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.80064>.

KORMANEC, Jan *et al.* The antitumor antibiotic mithramycin: new advanced approaches in modification and production. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 104, n. 18, p. 7701-7721, 20 jul. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-020-10782-x>.

LENNON, Frances E. *et al.* Overexpression of the μ -Opioid Receptor in Human Non-Small Cell Lung Cancer Promotes Akt and mTOR Activation, Tumor Growth, and Metastasis. **Anesthesiology**, [S.L.], v. 116, n. 4, p. 857-867, 1 abr. 2012. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/aln.0b013e31824babe2>.

LIEN, Wei-Chih *et al.* 7-hydroxy-staurosporine, UCN-01, induces DNA damage response, and autophagy in human osteosarcoma U2-OS cells. **Journal Of Cellular Biochemistry**, [S.L.], v. 119, n. 6, p. 4729-4741, 28 fev. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.26652>

MACHELSKA, Halina; CELIK, Melih Ö.. Opioid Receptors in Immune and Glial Cells—Implications for Pain Control. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 11, 4 mar. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2020.00300>.

MAIA, Eduardo Habib Bechelane *et al.* Structure-Based Virtual Screening: from classical to artificial intelligence. **Frontiers In Chemistry**, [S.L.], v. 8, 28 abr. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fchem.2020.00343>.

MALSY, Manuela *et al.* Staurosporine induces apoptosis in pancreatic carcinoma cells PaTu 8988t and Panc-1 via the intrinsic signaling pathway. **European Journal Of Medical Research**, [S.L.], v. 24, n. 1, p. 1-1, 28 jan. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s40001-019-0365-x>.

MARINHA DO BRASIL. **O que é a Amazônia Azul e por que o Brasil quer se tornar potência militar no Atlântico**. Brasília: Marinha do Brasil, 2020. Disponível em: <https://www.marinha.mil.br/economia-azul/noticias/o-que-%C3%A9-amaz%C3%B4nia-azul-e-por-que-o-brasil-quer-se-tornar-pot%C3%Aancia-militar-no-atl%C3%A2ntico>. Acesso em 25 jan. 2022.

MARINHO, Laura Cardoso de Oliveira. **Otimização da produção de cromomicinas a partir de *Streptomyces* sp. BRA-384 isolada de *Palythoa caribaeorum***. 2021. 64 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2021.

MATA, Juan Antonio *et al.* Exopolysaccharides produced by the recently described halophilic bacteria *Halomonas ventosae* and *Halomonas anticariensis*. **Research In Microbiology**, [S.L.], v. 157, n. 9, p. 827-835, nov. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2006.06.004>.

MEVS, U *et al.* *Modestobacter multiseptatus* gen. nov., sp. nov., a budding actinomycete from soils of the Asgard Range (Transantarctic Mountains). **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [S.L.], v. 50, n. 1, p. 337-346, 1 jan. 2000. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-50-1-337>.

MILOSLAVICH, Patricia *et al.* Marine Biodiversity in the Atlantic and Pacific Coasts of South America: knowledge and gaps. **PLoS One**, [S.L.], v. 6, n. 1, 31 jan. 2011. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0014631>.

MITTAL, Sonam; RAJALA, Maitreyi S.. Heat shock proteins as biomarkers of lung cancer. **Cancer Biology & Therapy**, [S.L.], v. 21, n. 6, p. 477-485, 31 mar. 2020. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/15384047.2020.1736482>.

MIYAMOTO, Akitomo *et al.* Increased proliferation of B cells and auto-immunity in mice lacking protein kinase C δ . **Nature**, [S.L.], v. 416, n. 6883, p. 865-869, abr. 2002. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/416865a>.

MURASE, Hirotaka *et al.* Evaluation of simultaneous binding of Chromomycin A3 to the multiple sites of DNA by the new restriction enzyme assay. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S.L.], v. 28, n. 10, p. 1832-1835, jun. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.04.013>.

NATOLI, Marina *et al.* Plinabulin, a Distinct Microtubule-Targeting Chemotherapy, Promotes M1-Like Macrophage Polarization and Anti-tumor Immunity. **Frontiers In Oncology**, [S.L.], v. 11, 3 mar. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2021.644608>.

NETTLES, James H. *et al.* Bridging Chemical and Biological Space: $\cdot\cdot$:target fishing $\cdot\cdot$ using 2d and 3d molecular descriptors. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 49, n. 23, p. 6802-6810, 19 out. 2006. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jm060902w>.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M.. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal Of Natural Products**, [S.L.], v. 79, n. 3, p. 629-661, 7 fev. 2016. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>.

NICHOLSON, Benjamin *et al.* NPI-2358 is a tubulin-depolymerizing agent: in-vitro evidence for activity as a tumor vascular-disrupting agent. **Anti-Cancer Drugs**, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 25-31, jan. 2006. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/01.cad.0000182745.01612.8a>.

NISHIZUKA, Yasutomi. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. **Nature**, [S.L.], v. 308, n. 5961, p. 693-698, abr. 1984. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/308693a0>.

NOGUEIRA, Clara Norões. **Prospecção de compostos com potencial anticâncer obtidos de microrganismos associados à ascídia Euherdmania sp.** 2019. 76 f. TCC (Graduação) - Curso de Biotecnologia, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

OCANA, Alberto *et al.* Activation of the PI3K/mTOR/AKT Pathway and Survival in Solid Tumors: systematic review and meta-analysis. **Plos One**, [S.L.], v. 9, n. 4, 28 abr. 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0095219>.

OMURA, Satoshi *et al.* A new alkaloid AM-2282 of Streptomyces origin taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization. **The Journal Of Antibiotics**,

[S.L.], v. 30, n. 4, p. 275-282, 1977. Japan Antibiotics Research Association. <http://dx.doi.org/10.7164/antibiotics.30.275>.

ŌMURA, Satoshi; ASAMI, Yukihiro; CRUMP, Andy. Staurosporine: new lease of life for parent compound of today's novel and highly successful anti-cancer drugs. **The Journal Of Antibiotics**, [S.L.], v. 71, n. 8, p. 688-701, 22 jun. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41429-018-0029-z>.

ORRIACH, Jose Luis Guerrero *et al.* Anesthesia in Combination with Propofol Increases Disease-Free Survival in Bladder Cancer Patients Who Undergo Radical Tumor Cystectomy as Compared to Inhalational Anesthetics and Opiate-Based Analgesia. **Oncology**, [S.L.], v. 98, n. 3, p. 161-167, 2020. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000504807>.

OU, Yi-Xin *et al.* Three new 2,5-diketopiperazines from the fish intestinal *Streptomyces* sp. MNU FJ-36. **Natural Product Research**, [S.L.], v. 30, n. 15, p. 1771-1775, 1 fev. 2016. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2015.1137570>.

PEÓN, Antonio *et al.* MolTarPred: a web tool for comprehensive target prediction with reliability estimation. **Chemical Biology & Drug Design**, [S.L.], v. 94, n. 1, p. 1390-1401, 22 abr. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/cbdd.13516>.

PERDICARIS, Stamatios *et al.* Bioactive Natural Substances from Marine Sponges: new developments and prospects for future pharmaceuticals. **Natural Products Chemistry & Research**, [S.L.], v. 01, n. 03, 2013. OMICS Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.4172/2329-6836.1000114>.

PINTO, Francisco das Chagas Lima. **Prospecção química dos zoantídeos *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing & Michelotti, 1860) e *Palythoa variabilis* (Duerden, 1898) e microbiota associada**. 2017. 204 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós Graduação em Química, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

PINTO, Francisco Chagas Lima *et al.* Dextrorotatory Chromomycins from the Marine *Streptomyces* sp. Associated to *Palythoa caribaeorum*. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, [S.L.], v. 31, n. 1, p. 144-152, 2020. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20190144>.

ROSKOSKI, Robert. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. **Pharmacological Research**, [S.L.], v. 79, p. 34-74, jan. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2013.11.002>.

SAHM, Bianca del Bianco. **Prospecção de substâncias com potencial anticâncer em microrganismos associados ao zoantídeo *Protospalythoa variabilis* (cnidaria, anthozoa)**. 2014. 104 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

SAKAI-KAWADA, Francis E. *et al.* Biosynthesis and Bioactivity of Prodiginine Analogs in Marine Bacteria, *Pseudoalteromonas*: a mini review. **Frontiers In Microbiology**,

[S.L.], v. 10, 24 jul. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.01715>.

SERTAN-DE GUZMAN, Alice A. *et al.* Pseudovibrio denitrificans strain Z143-1, a heptylprodigiosin-producing bacterium isolated from a Philippine tunicate. **Fems Microbiology Letters**, [S.L.], v. 277, n. 2, p. 188-196, dez. 2007. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00950.x>.

SHI, Yumiao *et al.* The kappa opioid receptor may be a potential tumor suppressor by regulating angiogenesis in breast cancer. **Medical Hypotheses**, [S.L.], v. 150, p. 110568, maio 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mehy.2021.110568>.

SHIEH, Wung Yang *et al.* Pseudovibrio denitrificans gen. nov., sp. nov., a marine, facultatively anaerobic, fermentative bacterium capable of denitrification. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [S.L.], v. 54, n. 6, p. 2307-2312, 1 nov. 2004. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.63107-0>.

SILVA, Alison Batista da. **Investigação química de extratos de bactérias marinhas associadas ao sedimento do arquipélago de São Pedro e São Paulo**. 2016. 117 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós Graduação em Química, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

SILVA, Alison B. da *et al.* Antibacterial Salinaphthoquinones from a Strain of the Bacterium Salinispora arenicola Recovered from the Marine Sediments of St. Peter and St. Paul Archipelago, Brazil. **Journal Of Natural Products**, [S.L.], v. 82, n. 7, p. 1831-1838, 17 jul. 2019a. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00062>.

SILVA, Alison B. da *et al.* 4-Hydroxy-pyran-2-one and 3-hydroxy-N-methyl-2-oxindole derivatives of Salinispora arenicola from Brazilian marine sediments. **Fitoterapia**, [S.L.], v. 138, out. 2019b. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2019.104357>.

SILVA, Amaro *et al.* Bioprospecting Anticancer Compounds from the Marine-Derived Actinobacteria Actinomadura sp. Collected at the Saint Peter and Saint Paul Archipelago (Brazil). **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, [S.L.], v. 28, n. 3, p. 465-474, 2016. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20160297>.

SILVA, Carla Cristina da *et al.* Antibacterial Activity of 2-Amino-1,4-naphthoquinone Derivatives Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacterial Strains and Their Interaction with Human Serum Albumin. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, [S.L.], v. 9, n. 31, set. 2020. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20200070>.

SIMONIN, F. *et al.* Kappa-Opioid receptor in humans: cDNA and genomic cloning, chromosomal assignment, functional expression, pharmacology, and expression pattern in the central nervous system.. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 92, n. 15, p. 7006-7010, 18 jul. 1995. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.92.15.7006>.

SIQUEIRA, Erlânia Alves. **Prodiginosinas isoladas de microrganismos associados a *Zoanthus sociatus* do arquipélago Fernando de Noronha com potencial anticâncer**. 2018. 92 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

SONG, Zhiqiang *et al.* Structures and Biological Activities of Diketopiperazines from Marine Organisms: a review. **Marine Drugs**, [S.L.], v. 19, n. 8, p. 403, 21 jul. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/md19080403>.

SOUSA, Thiciana da S. *et al.* Anthracyclines from *Micromonospora* sp. **Journal Of Natural Products**, [S.L.], v. 75, n. 3, p. 489-493, 17 jan. 2012. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/np200795p>.

SREELATHA, Thonthula *et al.* Synthesis and SAR study of novel anticancer and antimicrobial naphthoquinone amide derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S.L.], v. 24, n. 15, p. 3647-3651, ago. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.04.080>.

USTUN, Funda *et al.* Evaluation of morphine effect on tumour angiogenesis in mouse breast tumour model, EATC. **Medical Oncology**, [S.L.], v. 28, n. 4, p. 1264-1272, 22 jun. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12032-010-9573-5>.

VAN DER HEUL, Helga U. *et al.* Regulation of antibiotic production in Actinobacteria: new perspectives from the post-genomic era. **Natural Product Reports**, [S.L.], v. 35, n. 6, p. 575-604, 2018. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c8np00012c>.

VAN DER MERWE, E. *et al.* The synthesis and anticancer activity of selected diketopiperazines. **Peptides**, [S.L.], v. 29, n. 8, p. 1305-1311, ago. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2008.03.010>.

VENTOSA, Antonio *et al.* Halomonas. **Bergey'S Manual Of Systematics Of Archaea And Bacteria**, [S.L.], p. 1-111, 11 maio 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01190.pub2>.

WALI, Adil Farooq *et al.* Natural products against cancer: review on phytochemicals from marine sources in preventing cancer. **Saudi Pharmaceutical Journal**, [S.L.], v. 27, n. 6, p. 767-777, set. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2019.04.013>.

WANG, Yi *et al.* Developments around the bioactive diketopiperazines: a patent review. **Expert Opinion On Therapeutic Patents**, [S.L.], v. 23, n. 11, p. 1415-1433, 21 ago. 2013. Informa Healthcare. <http://dx.doi.org/10.1517/13543776.2013.828036>.

WEI, Xia *et al.* New Indole Diketopiperazine Alkaloids from Soft Coral-Associated Epiphytic Fungus *Aspergillus* sp. EGF 15-0-3. **Chemistry & Biodiversity**, [S.L.], v. 17, n. 5, maio 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cbdv.202000106>.

What is Cancer? - National Cancer Institute. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>>. Acesso em 20 jan. 2021.

WIESWEG, Marcel *et al.* Phosphorylation of p70 Ribosomal Protein S6 Kinase β -1 is an Independent Prognostic Parameter in Metastatic Colorectal Cancer. **Clinical Colorectal Cancer**, [S.L.], v. 17, n. 2, p. 331-352, jun. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clcc.2018.02.003>.

WILKE, Diego V. *et al.* Anticancer Potential of Compounds from the Brazilian Blue Amazon. **Planta Medica**, [S.L.], v. 87, n. 01/02, p. 49-70, 3 nov. 2020. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1055/a-1257-8402>.

WILSON, Micheal C. *et al.* An environmental bacterial taxon with a large and distinct metabolic repertoire. **Nature**, [S.L.], v. 506, n. 7486, p. 58-62, 29 jan. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature12959>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Medication Without Harm**. Geneva: World Health Organization, 2017. E-book (16 p.). Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-HIS-SDS-2017.6>. Acesso em: 28 jan. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The top 10 causes of death**. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>. Acesso em: 20 jan. 2022.

WU, Huixian *et al.* Structure of the human κ -opioid receptor in complex with JD1c. **Nature**, [S.L.], v. 485, n. 7398, p. 327-332, 21 mar. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature10939>.

YANG, Jian *et al.* PLC γ 1-PKC γ Signaling-Mediated Hsp90 α Plasma Membrane Translocation Facilitates Tumor Metastasis. **Traffic**, [S.L.], v. 15, n. 8, p. 861-878, 26 jun. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/tra.12179>.

YAO, Zhi-Jiang *et al.* TargetNet: a web service for predicting potential drug::target interaction profiling via multi-target sar models. **Journal Of Computer-Aided Molecular Design**, [S.L.], v. 30, n. 5, p. 413-424, maio 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10822-016-9915-2>.

YU, Liyan *et al.* Induction of cryptic bioactive 2,5-diketopiperazines in fungus *Penicillium* sp. DT-F29 by microbial co-culture. **Tetrahedron**, [S.L.], v. 73, n. 7, p. 907-914, fev. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2016.12.077>.

ZAGON, I. S.; HYTREK, S. D.; MCLAUGHLIN, P. J.. Opioid growth factor tonically inhibits human colon cancer cell proliferation in tissue culture. **American Journal Of Physiology-Regulatory, Integrative And Comparative Physiology**, [S.L.], v. 271, n. 3, p. 511-518, 1 set. 1996. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.1996.271.3.r511>.

ZENOVA, G. M. *et al.* Extremophilic and extremotolerant actinomycetes in different soil types. **Eurasian Soil Science**, [S.L.], v. 44, n. 4, p. 417-436, abr. 2011. Pleiades Publishing Ltd. <http://dx.doi.org/10.1134/s1064229311040132>.

ZHANG, Shuo *et al.* The Prognostic Role of Ribosomal Protein S6 Kinase 1 Pathway in Patients With Solid Tumors: a meta-analysis. **Frontiers In Oncology**, [S.L.], v. 9, 14 maio 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2019.00390>.

ZHAO, Kaili *et al.* Cyclic dipeptides: biological activities and self :assembled materials. **Peptide Science**, [S.L.], v. 113, n. 2, 10 out. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/pep2.24202>.

ZHENG, Dijie *et al.* Prodigiosin inhibits cholangiocarcinoma cell proliferation and induces apoptosis via suppressing SNAREs-dependent autophagy. **Cancer Cell International**, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 658, dez. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12935-021-02355-3>.

ZHOU, Qier *et al.* Opioids in cancer: the κ :opioid receptor (review). **Molecular Medicine Reports**, [S.L.], v. 25, n. 2, p. 44, 8 dez. 2021. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/mmr.2021.12560>.

ZHU, Junli *et al.* Diketopiperazines Synthesis Gene in *Shewanella baltica* and Roles of Diketopiperazines and Resveratrol in Quorum Sensing. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 67, n. 43, p. 12013-12025, 7 out. 2019. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.9b04620>.

ZIEGLER, Slava *et al.* Target Identification for Small Bioactive Molecules: finding the needle in the haystack. **Angewandte Chemie International Edition**, [S.L.], v. 52, n. 10, p. 2744-2792, 18 fev. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201208749>.

APÊNDICE A - LEVANTAMENTO DAS MOLÉCULAS IDENTIFICADAS NOS TRABALHOS DO MICROMARIN

Link para a planilha: [Apêndice A - Monografia Yuri Silva \(2022\)](#).

APÊNDICE B - MOLÉCULAS IDENTIFICADAS, CEPAS E CÓDIGOS SMILES

Link para a planilha: [Apêndice B - Monografia Yuri Silva \(2022\)](#).

**APÊNDICE C - *TARGET FISHING* DAS MOLÉCULAS IDENTIFICADAS NO
MICROMARIN**

Link para a planilha: [Apêndice C - Monografia Yuri Silva \(2022\)](#).