



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

BIANCA DEL BIANCO SAHM

**PROSPECÇÃO DE SUBSTÂNCIAS COM POTENCIAL ANTICÂNCER EM
MICRORGANISMOS ASSOCIADOS AO ZOANTÍDEO *Protopalythoa variabilis*
(CNIDARIA, ANTHOZOA).**

FORTALEZA
2014

BIANCA DEL BIANCO SAHM

**PROSPECÇÃO DE SUBSTÂNCIAS COM POTENCIAL ANTICÂNCER EM
MICRORGANISMOS ASSOCIADOS AO ZOANTÍDEO *Protopalythoa variabilis*
(CNIDARIA, ANTHOZOA).**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Leticia Veras Costa Lotufo
Co-orientador: Prof. Dr. Diego Veras Wilke

FORTALEZA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- S138p Sahn, Bianca Del Bianco.
Prospecção de substâncias com potencial anticâncer em microrganismos associados ao zoantídeo *Protopalythoa variabilis* (Cnidaria, Anthozoa) / Bianca Del Bianco Sahn. – 2014.
102 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Mestrado em Farmacologia, Fortaleza, 2014.
Área de Concentração: Bioprospecção de substâncias antitumorais.
Orientação: Profa. Dra. Leticia Veras Costa Lotufo.
Coorientação: Prof. Dr. Diego Veras Wilke.
1. Toxicidade. 2. Ensaio de Seleção de Medicamentos Antitumorais. 3. Produtos Biológicos. 4. Microrganismos Aquáticos. I. Título.

BIANCA DEL BIANCO SAHM

**PROSPECÇÃO DE SUBSTÂNCIAS COM POTENCIAL ANTICÂNCER EM
MICRORGANISMOS ASSOCIADOS AO ZOANTÍDEO *Protopalythoa variabilis*
(CNIDARIA, ANTHOZOA).**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Letícia Veras Costa Lotufo (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Diego Veras Wilke (Co-orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Gabriel Padilla
Universidade de São Paulo (ICB-USP)

Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço aos meus pais, José Alfredo Sahm e Marise Del Bianco Sahm, e a minha irmã Giulia Del Bianco Sahm, por todo o apoio, amor, carinho e educação ao longo da minha vida. Obrigada por acreditarem em mim, e por estarem sempre por perto. Sem vocês, este trabalho jamais teria existido. Agradeço aqui também, à minha amada família, Tia Marilde, Tio Atilio, Daiane, Gui, Julinha, Pedro, Neto, Carol, Léo, Maristela, Tia Cani, Manu, Vô Luiz, Vó Cida, Vó Lu, Tio Junior, Tarsila e Tio Luiz, vocês me fizeram forte sempre que precisei, obrigada pela compreensão da distancia e pelos abraços calorosos, cheios de saudade, sempre que eu voltava pra casa.

Com o mesmo amor no coração, agradeço a minha orientadora, e “mãe cearense”, Letícia Veras Costa Lotufo, que desde o início me recebeu de braços abertos e acreditou no meu potencial para com esse trabalho. Obrigada por todos os ensinamentos, por todos os incentivos ao longo destes anos, por todos os “carões”, por toda a disposição em fazer o projeto acontecer, pelos ótimos conselhos, por todos os beijos e abraços carinhosos, por acompanhar de perto a evolução de quem eu era quando entrei no laboratório, e quem sou atualmente. Obrigada por ser um espelho para mim e para toda a sociedade científica brasileira, e, definitivamente, obrigada por tornar meus sonhos realidade.

Diego Veras Wilke, serei eternamente grata por ter tido a chance de trabalhar lado a lado com você na bancada, e poder aprender tanto. Sinto o maior orgulho de te ter como co-orientador e amigo. Obrigada, do fundo do meu coração, por me passar um pouco desse seu entusiasmo e paixão pela ciência. Agradeço também toda a paciência e dedicação em me ensinar, passo a passo, todos os experimentos que fizemos juntos, foi de uma importância indescritível. Obrigada por acompanhar e comemorar todas as minhas conquistas neste trabalho, quero que saiba que elas foram suas também. Por fim, obrigada pela compreensão de alguns momentos e por sempre estar disponível quando eu precisei.

Paula Christine Jimenez, que teve um papel fundamental não só neste trabalho, mas na minha formação profissional, certamente. Obrigada por me inicializar no laboratório, o período de estágio com você foi sem dúvidas o momento em que eu mais aprendi e ganhei amor por tudo que realizamos juntas. Obrigada também por ter sido uma irmã, uma melhor amiga, uma fiel confidente de todas as

minhas angustias e ansiedades. Por todos os conselhos, por todo o carinho, por também ter acompanhado de perto todas as minhas conquistas e evolução, muito obrigada!

Aos meus companheiros de moradia, Amarilis Brandão de Paiva, Ligia Santana, Renan Saes “Daku” e Juliana de Carvalho Gaeta, e amigos queridos Marcionília Pimentel e Lucas Brito, que estiveram diretamente relacionados com este trabalho, obrigada por todas as opiniões, discussões sobre o tema, interesse, e ajuda com os experimentos. Principalmente, obrigada pelo companheirismo, cantorias, pelos almoços, pelas risadas, enfim, por dividirem comigo o dia a dia de vocês. Amo-os como irmãos.

Larissa Alves Guimarães foi outra peça fundamental nesta caminhada. Não tenho palavras para descrever o carinho e gratidão que sinto por você. Desde as aulas de farmacologia, até o dia a dia no laboratório, os sonhos compartilhados, as nossas conquistas juntas, nossas conversas, uma ajudando no trabalho da outra, etc. Acho que sempre funcionamos muito bem como uma equipe, obrigada por tudo e muito mais durante este período. Certamente, você não é só minha “colega” amada, é minha amiga, irmã, e anjo da guarda, uma joia rara que eu quero ter por toda a vida. Karine Pires, quero que se sinta enquadrada neste parágrafo, obrigada por toda a ajuda dedicada a realização deste trabalho, tanto na parte prática, quanto na psicológica.

Carlos Rocha, o meu muito obrigada a você que iniciou esse estudo como projeto de pós-doutorado. Sinta-se orgulhoso dos resultados encontrados aqui, eles são frutos das sementes que você plantou. Muito obrigada por toda a ajuda e por dividir comigo esse trabalho lindo.

À família Ecotox – Labomar: Elthon Gois Ferreira, Paula Abreu, Evelyne, Arinice, Évila, Lucas Buruaem, Rafael Vieira, Lívia, Breno, Andressa Pamela, Ivna, Allyson, Jeamylye, Lourdes Larissa, Lioísa, Luana, Renata, Fiamma, Eduardo “Picolé”, Caio Lívio, o meu muito obrigada por todos os dias de trabalho no laboratório, por toda a colaboração e por todos os ensinamentos aprendidos.

Tito Lotufo, muito obrigada por me ajudar com a montagem das relações filogenéticas das bactérias, pelas excelentes fotos, por toda a ajuda no laboratório, por todo o apoio durante o CBBM em Florianópolis e por todo o palpite e opinião com o trabalho.

Agradeço também a Silvana, Stefânio, Delano, Jércia, e Danilo Rocha, do laboratório de Oncologia Experimental, pela colaboração intelectual, elaboração e execução de alguns dos experimentos realizados.

Aos indispensáveis colegas da química, Profa. Dra. Otília Pessoa, sempre preocupada com o andamento dos experimentos, Dra. Ana Isabel Maia, pelos longos dias de extração, secagem, e análises dos extratos, Dra. Thiciana da Silva Sousa, pelo empenho em elucidar nossos extratos ativos, ao Doutorando Francisco das Chagas Lima Pinto por estar sempre disposto em ajudar, e a querida Ceíça, que nos cedeu Piericidina A para darmos continuidade aos experimentos. Apresento-lhes aqui, o resultado de todo o trabalho de vocês, obrigada!

Por fim, gostaria de agradecer a CAPES pela bolsa concedida, o apoio da rede de pesquisa SISBIOTA-Mar (<http://sisbiota.ufsc.br>), a qual este projeto faz parte, e ao programa de Pós-graduação em Farmacologia, pelas ajudas de custo na divulgação do trabalho em congressos.

“Quando nada é certo,
tudo é possível”
(Autor desconhecido)

RESUMO

Os produtos naturais apresentam um papel fundamental na descoberta de novos fármacos. Nesse contexto, os produtos naturais marinhos apresentam um grande potencial químico e farmacológico. Resultados prévios demonstraram um potencial químico e farmacológico promissor do zoantídeo *Protopalythoa variabilis* encontrado no litoral cearense. Por outro lado, fortes indícios apontam que os microrganismos associados sejam os verdadeiros responsáveis pelo elaborado arsenal de metabólitos secundários isolados de invertebrados marinhos. Dessa forma surgiu o interesse em estudar o potencial biomédico da microbiota associada ao *P. variabilis*. Os esforços para isolar as bactérias renderam um total de 10 colônias. Destas, 3 apresentaram padrões morfológicos típicos de actinomicetos e 2 delas foram estudadas neste trabalho. A cepa BRA-035 foi identificada como pertencente ao gênero de actinomicetos *Streptomyces*, e seu extrato acetato de etila, resultante da fermentação em meio A1, causou alta inibição do crescimento celular contra a linhagem de carcinoma de próstata metastático PC-3/M, com concentração inibitória média (CI_{50}) na ordem de pg/mL. O fracionamento bioguiado levou ao isolamento dos compostos glicopieridina A, pieridina D, e pieridina A, sendo que esta última apresentou elevada atividade antiproliferativa em linhagens tumorais de câncer de ovário (OVCAR-8), câncer de cólon (HCT-116) e PC-3/M, com CI_{50} encontradas na ordem de pico até fento molar. Apesar de já ter sido amplamente estudada, esta pode ser a primeira ocorrência de atividade antiproliferativa de Pieridina A contra as linhagens testadas neste trabalho, assim como a ordem de grandeza de sua potência. Outra cepa selecionada para estudo, a BRA-060, também foi identificada como pertencente ao gênero *Streptomyces*. Sua fermentação foi otimizada em meio *Marine Broth* para produção de extrato acetato de etila com citotoxicidade contra a linhagem de leucemia promielocítica HL-60 em ng/mL. O fracionamento bioguiado deste extrato resultou no isolamento de três dicetopiperazinas: a ciclo (L-Tyr-*trans*-L-Pro), a ciclo(L-Phe-*cis*-4-OH-D-Pro) e a ciclo(L-Phe-*trans*-4-OH-L-Pro). As dicetopiperazinas isoladas apresentaram potente atividade citotóxica contra as linhagens de glioblastoma (SF-295), câncer de ovário (OVCAR-8), HCT-116 e HL-60 e outra leuceumia K-562, com valores de CI_{50} variando de nano a micro molar. Embora suas estruturas já terem sido descritas pela literatura, nenhum trabalho foi feito quanto a suas atividades citotóxicas, podendo este ser o primeiro relato sobre

suas propriedades antitumorais. Esses resultados ressaltam a importância da microbiota associada ao zoantídeo *P. variabilis*, encontrado no litoral cearense, como fonte de compostos com potencial anticâncer.

Palavras-chave: Bioprospecção. Citotoxicidade. Antitumoral. Produtos naturais marinhos. Microrganismos associados a invertebrados marinhos. *Protopalythoa variabilis*.

ABSTRACT

Natural products exhibit a fundamental role in the discovery of new medicines. Marine natural products possess a huge chemical and pharmacological potential to yield new leads. Previous results support the promising chemical and pharmacological potential of the zoanthid *Protopalythoa variabilis* from the coast of Ceara State. On the other hand, strong evidences have indicated that associated microorganisms are the producers of the elaborate arsenal of secondary metabolites isolated from marine invertebrates. Then this study aimed to investigate the biomedical potential of associated microbiota to *P. variabilis*. The efforts to isolate associated bacteria yielded 10 different strains, and 3 of them showed typical actinomycete morphology. Here 2 of these actinomycetes had their anticancer potential studied. The strain BRA-035 belongs to the genus *Streptomyces*. BRA-035 culture using A1 broth yielded an acetate extract with potent cytotoxicity against a prostatic carcinoma cell line (PC-3/M), with inhibitory concentration mean (IC₅₀) value in pg/mL. The bioguided fractionation led to the isolation of glucopiericidin A, piericidin D and piericidin A, and the later showed high antiproliferative activity against ovarian cancer (OVCAR-8), colon cancer (HCT-116) and PC-3/M with IC₅₀ values ranging from pico to femtomolar. Although Piericidin A has been widely studied, this might be the first report of cytotoxic activity against the lineages tested in this work, as well as the magnitude of its potency. Another strain selected for this study, BRA-060, was identified as belong to the genus *Streptomyces* also. The fermentation was optimized in marine broth to produce an acetate extract highly cytotoxic against a leukemia cell line (HL-60). The bioguided fractionation of these extracts yielded three diketopiperazines: cyclo (L-Try-*trans*-L-Pro); cyclo (L-Phe-*cis*-4-OH-D-Pro) and cyclo (L-Phe-*trans*-4-OH-D-Pro). The diketopiperazines isolated showed potent cytotoxic activity against glioblastoma (SF-295), ovarian cancer (OVCAR-8), HCT-116, HL-60 and another leukemia (K-562) The IC₅₀ values ranging from nanomolar and micromolar. Although their structures have already been described in the literature, there was no previous report of their cytotoxic activities. Altogether, these results emphasize the value of microbiota associated with the zoanthid *P. variabilis*, found on the coast of Ceará State, as a source of active compounds.

Key-words: Bioprospection. Cytotoxicity. Antitumor. Marine natural products. Associated microorganisms of marine invertebrates. *Protopalythoa variabilis*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Distribuição proporcional para homens e mulheres dos 10 tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para 2014 (<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/tabelaestados.asp?UF=BR>)..... 1
- Figura 2 – Capacidades adquiridas pelas células tumorais e seus respectivos alvos de terapia direcionada. Abreviações: RFCE (Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico); FCVE (Fator de Crescimento Vascular Endotelial); RPPA (Ribose Polimerase Poli ADP); HGF/c-met (do inglês, *Hepatocyte Growth Factor*, Fator do Crescimento de Hepatócito proto-oncogene). (Adaptado de HANAHAN e WINBERG, 2011)..... 3
- Figura 3 – Substâncias em uso clínico para tratamento do câncer, datadas entre 1981 à 2010, divididos em categorias de acordo com sua origem: “B” biológico, geralmente uma proteína ou peptídeo grande (> 45 resíduos) isolado de um organismo ou linhagem celular, ou produzido por meios biotecnológicos; “N” produto totalmente natural; “ND” derivado semi-sintético de produto natural; “S” totalmente sintético, modificado a partir de um agente pré-existente; “S*” originado por síntese total, mas com o grupo farmacofórico de produto natural; “V” vacina; “NM” mímico funcional de um produto natural. (NEWMAN e CRAGG, 2012)..... 4
- Figura 4 – Substâncias isoladas a partir de produtos naturais marinhos, entre 1965 e 2006, evidenciando o aumento exponencial a partir da década de 70 (COSTA-LOTUFO et al., 2009)..... 5
- Figura 5 – Quantidade relativa de compostos marinhos registrados entre 1990 e 2009, agrupados por filo. (Adaptado de LEAL et al., 2012)..... 7
- Figura 6 – Fotografias de colônias do zoantídeo *Protopalythoa variabilis* encontrados na costa cearense. A) colônia submersa com pólipos abertos e B) colônia exposta ao ar com pólipos fechados durante a maré baixa. Por Diego V. Wilke..... 9

Figura 7 – Diversidade e estrutura das comunidades bacterianas associadas aos zoantídeos <i>P. caribaeorum</i> , <i>Z. sociatus</i> , <i>P. variabilis</i> e água do mar, coletados na praia do Paracuru, estado do Ceará. (Adaptado de RABELO, 2012).....	13
Figura 8 – Desenho experimental do presente trabalho.....	15
Figura 9 – Mapa de referência indicando os locais de coleta para o invertebrado <i>Protopalythoa variabilis</i> na costa cearense.....	16
Figura 10 – Percentual de inibição do crescimento da linhagem de câncer de próstata metastático (PC-3/M) após 72h de incubação com 50 µg/mL dos extratos obtidos das colônias isoladas de <i>Protopalythoa variabilis</i>	28
Figura 11 – Imagem da colônia formada por BRA 035 em placa de ágar contendo meio A1. A) Imagem panorâmica; B) Imagem evidenciando a formação de esporos de coloração branca Fotos: Tito M. Lotufo.....	30
Figura 12 – Cladograma de agrupamento para BRA 035. Método Maximum likelihood – RaxML.....	30
Figura 13 – Estudo da correlação da biomassa e atividade em função do tempo de cultivo da cepa BRA 035 (<i>Streptomyces sp</i> isolada de <i>P. variabilis</i>). Correlação negativa entre biomassa e bioatividade. A esquerda, em azul, valores de biomassa (g/L); a direita, em vermelho, valores de bioatividade CI ₅₀ (ng/mL).....	31
Figura 14 – A) Fluxograma de fracionamento do extrato bruto da BRA-035 (Em vermelho – frações ativas). B) Cromatograma CLAE de fase reversa do extrato EAcE de <i>Streptomyces sp</i> . Gradiente linear acetonitrila/água 5-95%, taxa de fluxo de 4.72mL/minuto por um período de 30 minutos.....	32
Figura 15 – Cromatograma HPLC de fase reversa da fração P8, comprovando sua pureza.....	33

Figura 16 – Estrutura química do composto “P8”, identificado como Piericidina A ($C_{25}H_{37}NO_4$) isolado de <i>Streptomyces sp</i> (YOSHIDA, SHIRAISHI e TAKAHASHI, 1977).....	34
Figura 17 – Estrutura química dos compostos presentes na fração “F7”de EAcE-035. glucopiericidina A e piericidina D.....	34
Figura 18 – Curvas concentração-efeito de piericidina A isolada de <i>Streptomyces sp</i> sobre as linhagens celulares PC-3, PC-3/M, OVCAR-8, HCT-116, SF-295 e HL-60, avaliadas pelo ensaio do MTT após 72 horas de incubação.....	36
Figura 19 – Gráfico mostrando a média de inibição do crescimento celular em 6 linhagens tumorais, de acordo com a concentração testada de Piericidina A, isolada de <i>Streptomyces sp</i> . Concentrações escolhidas para análise: 20nM, 200pM, 200fM e 200aM. Gráfico plotado utilizando o programa GraphPad Prism 5.0.....	39
Figura 20 – Percentual de inibição do crescimento celular exercido pelo extrato da cepa BRA 060, contra 3 linhagens tumorais (PC-3/M, HCT-116 e HL-60), à concentração de 50µg/ml, incubado por 72 horas.....	40
Figura 21 – Colônias de BRA 060 em placa contendo meio ágar. A) Imagem panorâmica; B) Imagem evidenciando a formação de esporos de coloração branca e acinzentada ao redor das colônias. Fotos: Tito M. Lotufo.....	41
Figura 22 – Cladograma de agrupamento para BRA 060. Método Maximum likelihood – RaxML.....	42
Figura 23 – Crescimento da cepa BRA 060 em diferentes meios de cultura líquido. A) fermentação em meio A1 à direita, e Marine Broth a esquerda; B) após extração, fases solvente, aquoso e biomassa em funis de separação, à direita meio A1 e à esquerda meio Marine Broth. Foto: Bianca D. B. Sahm.....	43
Figura 24 – Fluxograma de fracionamento do extrato bruto da BRA-006 (Em vermelho – frações ativas).....	44

Figura 25 – Atividade citotóxica do primeiro fracionamento de EAcE-060, executado por coluna contendo sílica flash. Linhagem utilizada: HCT-116. Concentração testada: 5µg/mL, 72 horas de incubação.....	44
Figura 26 – Cromatograma de fase reversa (CLAE) da fração E de EAcE-060, indicando as delimitações das frações obtidas.....	45
Figura 27 – Estrutura química dos compostos presentes nas frações Fr4, Fr6 e Fr7 de EAcE-060 E obtidas dos extrato bruto da BRA-060. Phe (Phenilalanina); Try (Tisorina); 4-OH-Pro (4-Hidroxi prolina); Pro (Prolina).....	46
Figura 28 – Esquema demonstrativo do transporte de elétrons através da membrana interna mitocondrial evidenciando o sítio de ação do composto piericidina A. (Adaptado de ALBERTS et al. 1998).....	54

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Compostos de origem marinha, natural ou derivados, aprovados para uso ou em fase de teste clínico (COSTA-LOTUFO et al, 2009; GERWICK e MOORE, 2012; IMHOFF, LABES e WIESE, 2011; MAYER et al., 2010; NEWMAN e CRAGG, 2012); <http://clinicaltrials.gov>; <http://ema.europa.eu> - acessados em novembro de 2013..... 7
- Tabela 2 – Relação proporcional de solventes utilizados para o fracionamento de EAcE – 060. Hex – Hexano; AcOEt – Acetato de Etíla; MeOH – Metanol..... 22
- Tabela 3 – Linhagens de células tumorais utilizadas. Codificação da linhagem, tipo histológico, procedência da cultura e quantidade de células por ml para plaqueamento dos experimentos..... 23
- Tabela 4 – Colônias isoladas de bactérias associadas ao zoantídeo *P. variabilis*. Detalhamento do seu local de origem, classificação quanto as suas características visuais, e meio de cultura do isolamento inicial..... 27
- Tabela 5 – Concentração inibitória média (CI_{50}) do extrato acetato-etílico de BRA 035 testados em diferentes concentrações (0,00032 à 50 μ g/mL) e incubado por 72 horas em diferentes linhagens tumorais celulares. CI_{50} (μ g/mL) e IC95% obtidas através de regressão não linear..... 29
- Tabela 6 – Atividade citotóxica do fracionamento do extrato bruto de BRA 035 contra PC-3/M por 72 horas de incubação. CI_{50} obtida através de regressão não linear.. 33
- Tabela 7 – Atividade citotóxica de Piericidina A isolada de *Streptomyces sp* contra diversas linhagens celulares tumorais, avaliada pelo ensaio do MTT depois do período de 72 horas de incubação. CI_{50} (nM) e IC – 95% determinados por regressão não-linear no programa GraphPad Prism 5.0..... 35

Tabela 8 – Concentração inibitória média (CI ₅₀) e intervalo de confiança de 95% (IC95%) do extrato acetato-etílico da cepa BRA 060 testado em diferentes concentrações (0,00032 à 50µg/mL) e incubado por 72 horas, contra as linhagens HCT-116 e HL-60. Valores obtidos através de regressão não linear.....	40
Tabela 9 – Atividade citotóxica do fracionamento da fração E de EAcE-060 contra HL-60 por 48 horas de incubação. CI ₅₀ obtida através de regressão não linear....	45
Tabela 10 – CI ₅₀ e IC 95% (µg/mL) das frações resultantes de EAcE-060 E por CLAE, contra as linhagens HL-60, K-562, HCT-116, OVCAR-8 e SF-295. Resultados obtidos através do ensaio antiproliferativo AlamarBlue.....	47
Tabela 11 – CI ₅₀ e IC 95% (µg/mL) das frações resultantes de EAcE-060 E por CLAE, contra as linhagens leucêmicas HL-60 e K-562, incubadas por 24 e 72 horas. Resultados obtidos pelo ensaio antiproliferativo AlamarBlue.....	47
Tabela 12 – Atividade citotóxica reportada para os diferentes tipos de Piericidina de acordo com a literatura. CI ₅₀ (nM/ml); ND = não divulgado pelo autor.....	52
Tabela 13 – Dicotopiperazinas isoladas de microrganismos marinhos e suas respectivas atividades biológicas (adaptado de HUANG et al., 2010).....	60

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 O câncer como doença alvo.....	1
1.2 Produtos naturais marinhos.....	4
1.3 <i>Protopalythoa variabilis</i>	9
1.4 Microrganismos associados.....	10
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo geral.....	14
2.2 Objetivos específicos.....	14
3 MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1 Desenho experimental.....	15
3.2 Coleta dos zoantídeos.....	16
3.3 Processamento do material.....	17
3.3.1 Meios de cultura sólido.....	17
3.3.2 Meio de cultura líquido.....	17
3.4 Isolamento dos microrganismos associados.....	18
3.4.1 Depósito em banco de bactérias e triagem de bioatividade.....	18
3.4.2 Identificação molecular.....	19
3.5 Estudos com BRA 035.....	19
3.5.1 Estudo de crescimento bacteriano – relação biomassa e atividade biológica.....	19
3.5.2 Fermentação em larga escala.....	20
3.5.3 Fracionamento do extrato acetato de etíla da cepa BRA 035 (EAcE - 035).....	20
3.5.3.1 Isolamento de piericidinas – determinação estrutural.....	21
3.6 Estudos com BRA 060.....	21
3.6.1 Fermentação em larga escala.....	21
3.6.2 Fracionamento do extrato acetato de etíla da cepa BRA 060 (EAcE-060).....	21

3.6.2.1 Isolamento de Diketopiperazinas – determinação estrutural.....	22
3.7 Estudos da atividade biológica.....	23
3.7.1 Cultivo de linhagens celulares.....	23
3.7.2 Teste de viabilidade celular.....	24
3.7.2.1 Ensaio do MTT.....	24
3.7.2.2 AlamarBlue®.....	25
4 RESULTADOS.....	27
4.1 Obtenção dos microrganismos associados.....	27
4.2 Triagem de bioatividade.....	28
4.2.1 Análise qualitativa.....	28
4.3 Estudos com BRA 035.....	29
4.3.1 Estudo com perfil de atividade citotóxica do extrato bruto de BRA 035.....	29
4.3.2 Caracterização visual e identificação molecular da cepa BRA 035.....	29
4.3.3 Estudo do tempo de cultivo e relação com a biomassa e atividade biológica da cepa BRA 035.....	30
4.3.4 Fracionamento bioguiado BRA 035.....	31
4.3.5 Identificação dos compostos presentes nas frações “F7” e “P8”.....	33
4.3.6 Avaliação da atividade biológica de piericidina A.....	35
4.3.6.1 Estudo da citotoxicidade in vitro.....	35
4.3.6.2 Curvas de concentração efeito.....	35
4.4 Estudo com BRA 060.....	39
4.4.1 Estudo do perfil de atividade citotóxica do extrato bruto da cepa BRA 060.....	39
4.4.2 Caracterização visual e identificação molecular da cepa BRA 060.....	40
4.4.3 Obtenção do extrato bruto – melhoramento da condição de cultivo.....	40
4.4.4 Fracionamento bioguiado.....	43
4.4.5 Identificação dos compostos das frações Fr4 Fr6 e Fr7.....	46
4.4.6 Avaliação da atividade biológica.....	46
5 DISCUSSÃO.....	48
5.1 Estudos com BRA 035.....	51
5.2 Estudos com BRA 060.....	59



6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	65
7 CONCLUSÕES.....	66
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
ANEXO A – Espectro HR-ESI-MS do composto “P8”.....	78
ANEXO B – Análises de C ¹³ e H ¹ dos dados de ressonância magnética nuclear para o composto P8.....	79
ANEXO C – Espectro de Espectro de H ¹ referente a ressonância magnética nuclear e cromatograma de CLAE para o composto Fr4.....	80
ANEXO D – Espectro de H ¹ referente a ressonância magnética nuclear para o composto Fr6.....	81
ANEXO E – Espectro de H ¹ referente a ressonância magnética nuclear para o composto Fr7.....	82

1 INTRODUÇÃO

1.1 O câncer como doença alvo

O termo câncer compreende um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que possuem capacidade de invadir tecidos circunjacentes e metastizar para outras regiões do corpo (INCA, 2013 – <http://www.inca.gov.br>). Segundo a organização mundial de saúde (WHO, do inglês *World Health Organization*), em 2008, as neoplasias malignas vitimaram mais de 7,6 milhões de pessoas. Esse número corresponde a 13% do total, e classifica o câncer como uma das maiores causas de morte por doença no mundo (WHO, 2013). A incidência mundial da doença chega a mais de 12,6 milhões de novos casos, dentre os quais 56% têm ocorrido nos países em desenvolvimento. No Brasil, a incidência de câncer é bastante relevante, com mais de 250 mil casos por ano (INCA, 2012). A figura 1 mostra a distribuição de ocorrência dos 10 tipos de câncer mais frequentes no país para 2014, proporcional para homens e mulheres.

Figura 1 – Distribuição proporcional para homens e mulheres dos 10 tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para 2014 (<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/tabelaestados.asp?UF=BR>).

Localização primária	casos novos	%			Localização primária	casos novos	%
Próstata	68.800	22,8%	Homens		Mama Feminina	57.120	20,8%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%			Cólon e Reto	17.530	6,4%
Cólon e Reto	15.070	5,0%			Colo do Útero	15.590	5,7%
Estômago	12.870	4,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Cavidade Oral	11.280	3,7%			Glândula Tireoide	8.050	2,9%
Esôfago	8.010	2,6%			Estômago	7.520	2,7%
Laringe	6.870	2,3%			Corpo do Útero	5.900	2,2%
Bexiga	6.750	2,2%			Ovário	5.680	2,1%
Leucemias	5.050	1,7%			Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%			Leucemias	4.320	1,6%
			Mulheres				

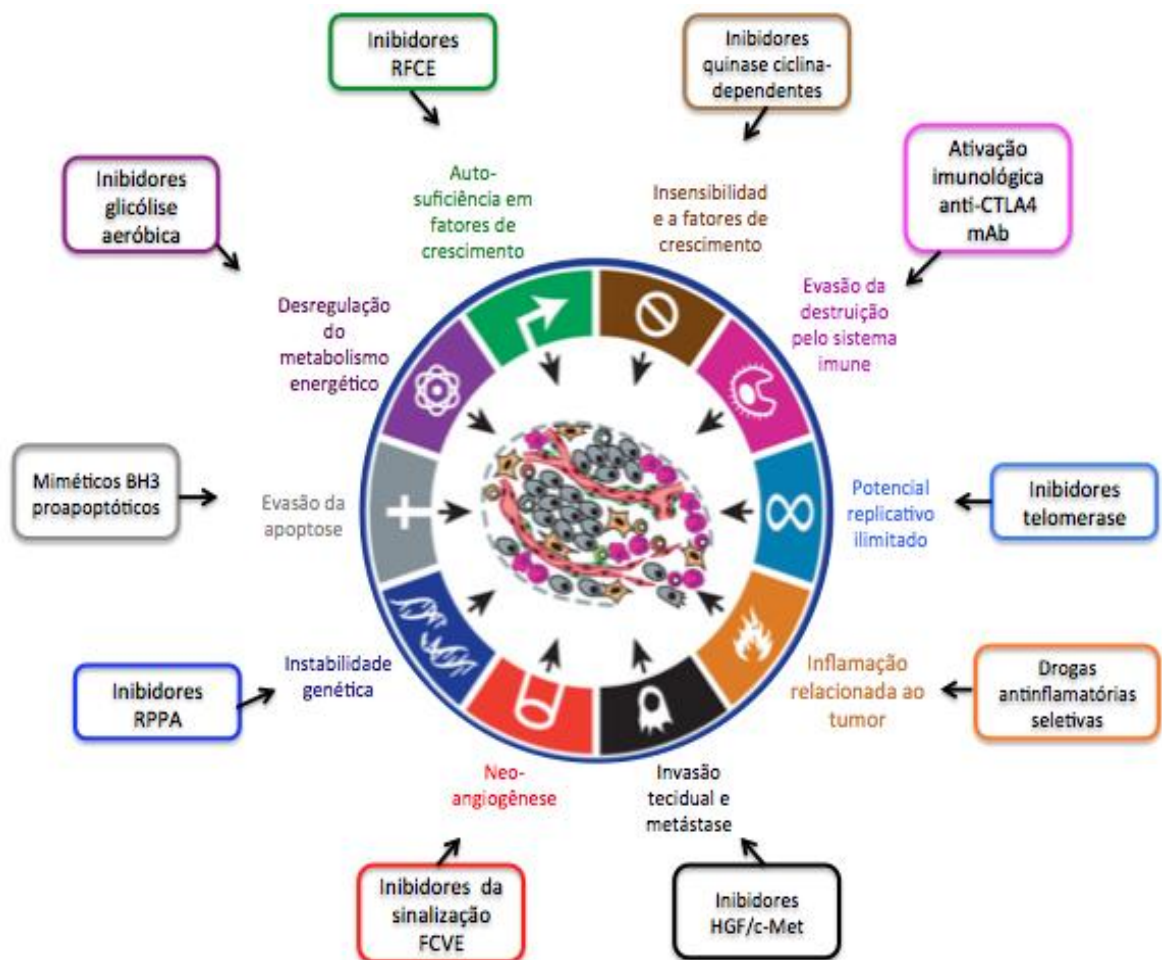
As estratégias clássicas para o tratamento de pacientes com câncer envolvem cirurgia, quimioterapia e radioterapia (SALGALLER e LODGE, 1998; INCA 2014). No caso da quimioterapia, por mais que já se tenha um considerável número de quimioterápicos de sucesso em uso, acredita-se que aproximadamente metade

dos pacientes ainda não respondam adequadamente ou se deparam com o retorno da doença (WAGNER-DÖBLER et al., 2002). Além disso, as células tumorais rapidamente adquirem resistência contra várias drogas citotóxicas. Em contraste, células normais permanecem sensíveis a estas drogas, mesmo sob tratamentos prolongados (DUESBERG et al., 2007), resultando em efeitos colaterais severos para os pacientes em tratamento. Assim disso, a busca por substâncias com maior potência terapêutica e menor índice de resistência, que sejam mais seletivas para as células tumorais diminuindo seus efeitos colaterais, ainda é de extrema relevância para câncer.

Biologicamente, o câncer envolve mudanças dinâmicas no genoma celular, silencia ou deleta genes supressores de tumor e estimula a atividade de oncogêneses, gerando defeitos no circuito regulatório que governa a proliferação e homeostase em células normais (HANAHAN e WEINBERG, 2000). Em 2011, Hanahan & Weinberg apresentaram uma análise atualizada sobre como células normais evoluem progressivamente para o estado neoplásico, listando 10 capacidades adquiridas em comum para todos os tipos de câncer, a saber: instabilidade genética, autossuficiência em fatores do crescimento, insensibilidade a supressores do crescimento, evasão da destruição pelo sistema imune, potencial replicativo ilimitado, inflamação relacionada ao tumor, invasão tecidual e metástase, indução a angiogênese, evasão da apoptose e desregulação do metabolismo energético (figura 2).

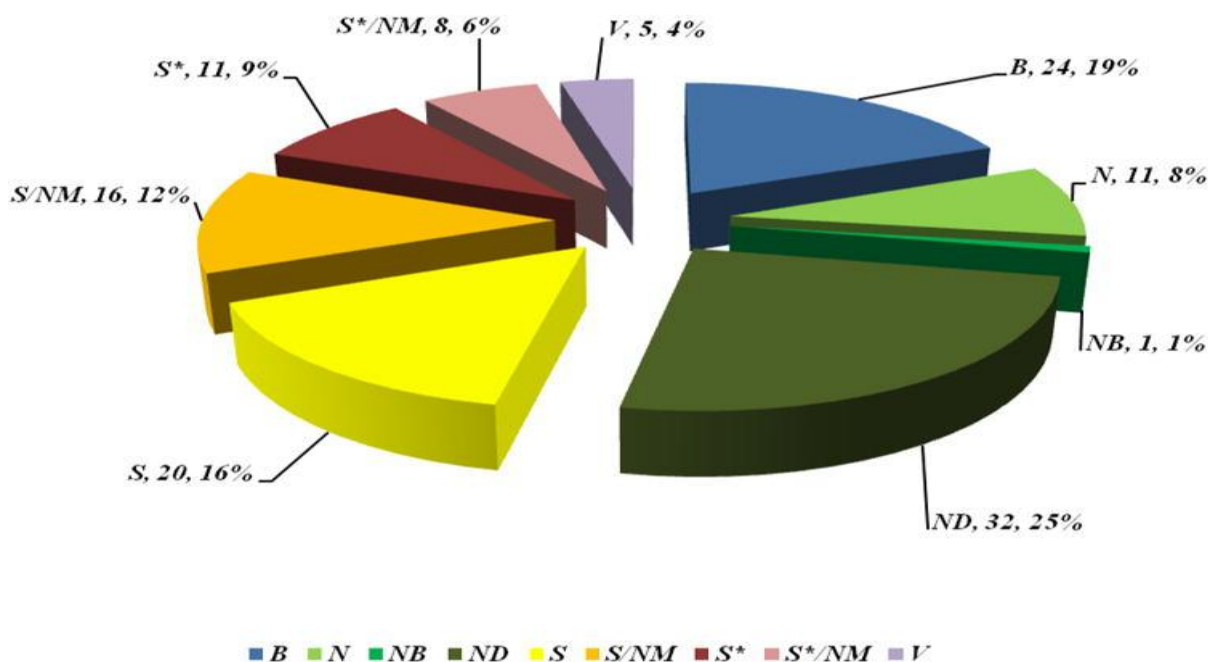
A descrição destas principais mudanças fisiológicas é uma ferramenta importante para o desenvolvimento de terapias direcionadas, que podem ser classificadas de acordo com seus respectivos efeitos sobre uma ou mais capacidades adquiridas pela célula tumoral (figura 2). Se a capacidade for deveras importante para a biologia do tumor, a inibição desta deve enfraquecer o seu crescimento e progressão. Tal especificidade de ação vem sendo considerada uma virtude, pois apresenta atividade inibitória contra um determinado alvo, ao mesmo tempo que, em princípio, possui relativamente menos efeitos em outros, e, por tanto, menos toxicidade e efeitos colaterais sistêmicos (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

Figura 2 – Capacidades adquiridas pelas células tumorais e seus respectivos alvos de terapia direcionada. Abreviações: RFCE (Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico); FCVE (Fator de Crescimento Vascular Endotelial); RPPA (Ribose Polimerase Poli ADP); HGF/c-met (do inglês, *Hepatocyte Growth Factor*, Fator do Crescimento de Hepatócito proto-oncogene). (Adaptado de HANAHAN e WINBERG, 2011).



Produtos naturais apresentam papel fundamental na descoberta de novos compostos, que abrangem uma série de indicações terapêuticas e mostram uma grande diversidade de estruturas químicas (HARVEY, 2008), podendo ainda, servir de inspiração para a síntese de novas estruturas. NEWMANN & CRAGG apresentaram, em 2012, uma análise atualizada destes processos de exploração datados desde 1981 até 2010. O grande valor dos compostos naturais na descoberta de novas drogas torna-se evidente particularmente no caso do câncer, onde, das 172 moléculas em uso clínico, aproximadamente 60% são de origem natural (figura 3) (NEWMANN & CRAGG, 2012).

Figura 3 – Substâncias em uso clínico para tratamento do câncer, datadas entre 1981 à 2010, divididas em categorias de acordo com sua origem: “B” biológico, geralmente uma proteína ou peptídeo grande (> 45 resíduos) isolado de um organismo ou linhagem celular, ou produzido por meios biotecnológicos; “N” produto totalmente natural; “ND” derivado semi-sintético de produto natural; “S” totalmente sintético, modificado a partir de um agente pré-existente; “S*” originado por síntese total, mas com o grupo farmacofórico de produto natural; “V” vacina; “NM” mímico funcional de um produto natural. (NEWMAN e CRAGG, 2012).



1.2 Produtos naturais marinhos

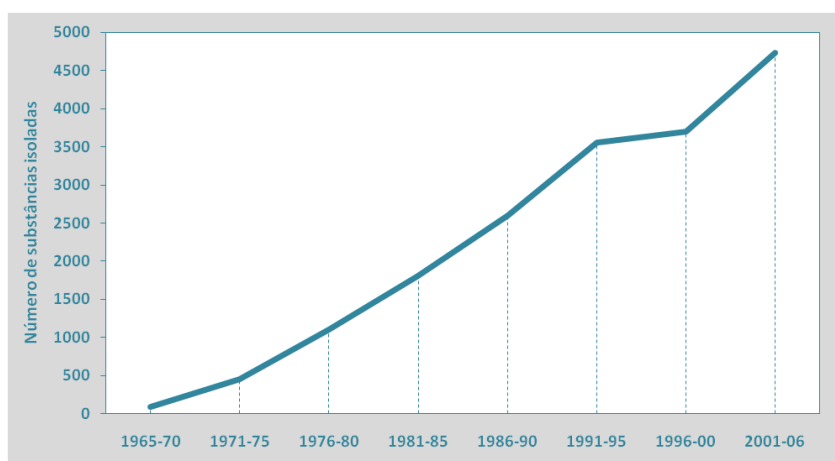
O uso da natureza como fonte de medicamento pelo homem data desde os tempos mais antigos. As plantas, sem dúvidas, foram as primeiras a serem exploradas. Preparações e usos de óleos, extratos e chás estão documentados entre 2.900 e 2.600 a.c, tendo como precursores os mesopotâmicos e egípcios, seguindo da medicina tradicional chinesa (HUANG, 1999; BORCHARDT, 2002).

A exploração de produtos naturais não é menos importante nos dias atuais. A grande diversidade química distribuída entre as milhões de espécies de plantas, animais, fungos e microrganismos, reflete o peso da evolução na seleção e conservação de estratégias de sucesso, seja para defesa contra predadores,

competição por espaço e alimento, ou resistência a condições extremas (CRAGG et al., 1997; FARNSWORTH et al., 1985). A diversidade dos produtos naturais com aplicação farmacológica arranja-se dentro da categoria dos metabólitos secundários, as moléculas que são produzidas por vias condicionadas e ativadas em contextos ou situações particulares (CLARDY e WALSH, 2004), como as descritas acima.

Além das clássicas fontes terrestres como as plantas, bactérias e fungos, um campo que vem ganhando destaque é a pesquisa com produtos naturais de origem marinha (MOLINSKI et al., 2009; NEWMAN e CRAGG, 2004). Mares e oceanos ocupam mais de 2/3 da superfície terrestre e abrigam 34 dos 36 filos que representam todos os organismos vivos, sendo, inclusive, alguns filos estritamente marinhos. Até a década de 1950, o ecossistema marinho escapou dos estudos dos químicos de produtos naturais, principalmente devido ao difícil acesso às suas profundidades. O início sistemático da prospecção de produtos naturais marinhos ocorreu na década de 70, época em que ocorreu avanço da tecnologia e estabelecimento de condições seguras de mergulho. (Figura 4) (FENICAL, 2006; COSTA-LOTUFO et al., 2009).

Figura 4 – Substâncias isoladas a partir de produtos naturais marinhos, entre 1965 e 2006, evidenciando o aumento exponencial a partir da década de 70 (COSTA-LOTUFO et al., 2009).



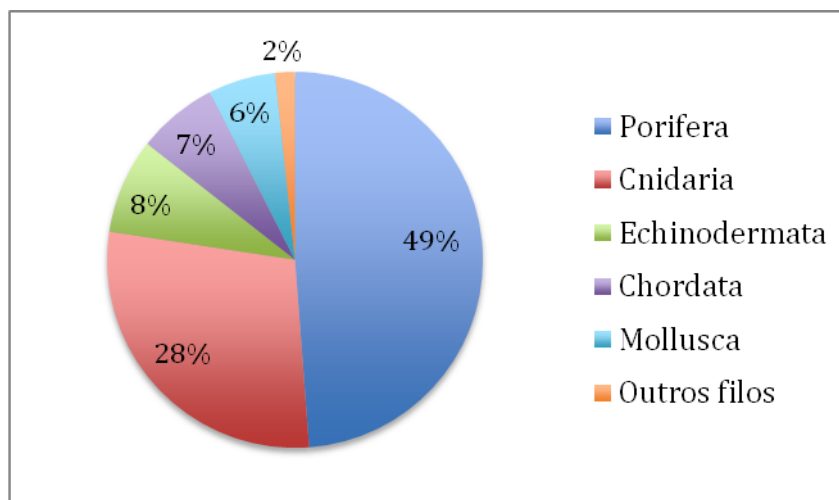
Em certos ecossistemas marinhos, como os recifes de coral ou áreas de grande profundidade, estima-se que a diversidade biológica seja maior do que em uma floresta tropical. Muitos organismos marinhos possuem corpo mole e vida sedentária, necessitando de mecanismos químicos de defesa. Para este fim, eles

desenvolveram a habilidade de sintetizar compostos tóxicos. Além disso, produtos naturais liberados na água são rapidamente diluídos e, por isso, precisam ser altamente potentes para exercer algum efeito (HAEFNER, 2003).

Inspirados pela dimensão dos oceanos e pelo ainda desconhecido nível de biodiversidade no ambiente marinho, pesquisadores vem perseguindo entusiasticamente o potencial farmacológico dos metabólitos secundários de organismos marinhos (GLASER e MAYER, 2009). Programas iniciais do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI-USA) demonstraram que os invertebrados marinhos são promissoras fontes na busca por moléculas potentes. O impulso decisivo para esta nova era de bioprospecção foi dado pelo próprio NCI, quando foi revelado que bioensaios com extratos de organismos marinhos eram mais efetivos em oferecer drogas anticâncer do que as amostras coletadas no ambiente terrestre (FENICAL et al., 2008).

De fato, a maior parte dos produtos naturais marinhos, conhecidos até o momento, foram isolados de invertebrados deste ambiente. Representantes dos filos Porífera (esponjas), e Cnidária (águas-vivas, anêmonas-do-mar, e corais), tem sido reconhecidos como os grupos de invertebrados marinhos quimicamente mais prolíficos (figura 5), isto se deve, possivelmente, pela ampla ocorrência e fácil acesso a estes animais, que são habitantes comuns de recifes de coral (HU et al., 2011; HUNT e VINCENT, 2006; LEAL et al., 2012).

Figura 5 – Quantidade relativa de compostos marinhos registrados entre 1990 e 2009, agrupados por filo. (Adaptado de LEAL et al., 2012).



Apesar do ainda reduzido número de fármacos de origem marinha, existe um número considerável de substâncias em fase de testes pré-clínicos e clínicos para tratamento de enfermidades, o que ressalta o potencial destas moléculas na cura de doenças. A tabela abaixo (tabela 1) lista estes compostos e outros que foram aprovados pelo FDA (do inglês, *Food and Drug Administration* – USA) e EMEA (do inglês, *European Medicines Agency* – EU), ou que estão em teste clínico nos dias atuais. É importante notar aqui, a esmagadora indicação destas substâncias para o tratamento do câncer.

Tabela 1 – Compostos de origem marinha, natural ou derivados, aprovados para uso ou em fase de teste clínico (COSTA-LOTUFO et al, 2009; GERWICK e MOORE, 2012; IMHOFF, LABES e WIESE, 2011; MAYER et al., 2010; NEWMAN e CRAGG, 2012); <http://clinicaltrials.gov>; <http://ema.europa.eu> - acessados em novembro de 2013.

Status clínico	Composto (nome comercial)	Inicialmente isolado de:	Derivado ou Produto Natural	Indicação terapêutica
Aprovado	Cytarabina Ara-C (Cytosar-U1)	<i>Tethya crypta</i> (Esponja)	Derivado	Anticâncer
	Vibarabina Ara-A (Vira-A1)	<i>Tethya crypta</i> (Esponja)	Derivado	Antiviral
	Ziconotídeo (Prialt)	<i>Conus magnus</i> (Molusco)	Produto Natural	Dor crônica

	Eribulina (Halaven)	<i>Halicondria okadai</i> (Esponja)	Derivado	Anticâncer
	Omega-3 etil ester (Lovaza)	Peixes	Derivado	Hipertrigliceridemia
	Brentixumab vetodin (Adcetris)	<i>Dolabella auricularia</i> (Molusco)	Derivado	Anticâncer
	Trabectedina (Yondelis)	<i>Esteinascidia</i> turbinata (Ascídia)	Produto Natural	Anticâncer
Fase III	Plitidepsina (Aplidina)	<i>Aplidin albicans</i> (Ascídia)	Produto Natural	Anticâncer
	Soblidotina TZT 1027	<i>Dolabella auricularia</i> (Molusco)	Derivado	Anticâncer
	Glembatumumab vedotin CDZ-011	<i>Dolabella auricularia</i> (Molusco)	Derivado	Anticâncer
Fase II	Salinosporamida A NPI-0052 (Marizomib)	<i>Salinispora tropica</i> (Actinomiceto)	Produto Natural	Anticâncer
	Pseudopterosina	<i>Pseudopetogorgia</i> <i>elisabethae</i> (Gorgônia)	Produto Natural	Cicatrização
	DMXBA GTS-21	(Nematelminto)	Derivado	Esquizofrenia e Alzheimer
	Plinabulina NPI-2358	<i>Aspergillus sp</i> (Fungo)	Derivado	Anticâncer
	Elisidepsina (Irvalec)	<i>Elysia rufences</i> (Molusco)	Derivado	Anticâncer
	Tasidotina (Zalypsis)	<i>Jorunna funebris</i> (Molusco)	Derivado	Anticâncer
	Briostatina 1	<i>Bugula neritina</i> (Briozoário)	Produto Natural	Anticâncer e Alzheimer
Fase I	SGN-75	(Molusco)	Derivado	Anticâncer
	ASG-5ME	(Molusco)	Derivado	Anticâncer
	Sintadotina ILX651	<i>Dolabella auricularia</i> (Molusco)	Derivado	Anticâncer
	Hemiasterlina E7974	<i>Hemiasterella minor</i> (Esponja)	Derivado	Anticâncer

Apesar de promissores, muitas vezes o prosseguimento dos experimentos e estudos com produtos naturais obtidos de invertebrados marinhos são comprometidos devido à dificuldade de obter quantidade suficiente dos compostos ativos. Para sanar esse problema, diferentes técnicas têm sido desenvolvidas como

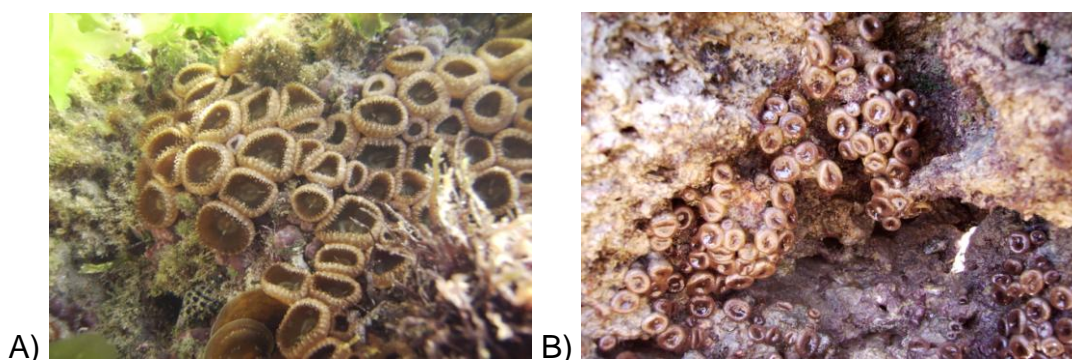
cultivos dos animais pela maricultura, síntese da molécula e, mais recentemente, o cultivo dos microrganismos associados aos animais marinhos (FENICAL e JENSEN, 2006).

O alcaloide Ecteinascidina 743 (Trabectedina; Yondelis®), isolado do tunicado colonial *Ecteinascidia turbinata*, foi aprovado em 2007 pela EMEA para tratamento de sarcomas de tecido mole e em 2009, combinado com Doxorubicina, para tratamento de câncer de ovário reincidente (CRAGG e NEWMAN, 2013). Os testes iniciais foram executados com material coletado do mar e, do cultivo dos organismos produtores, mas sua comercialização somente foi viabilizada pela semi-síntese usando a produção biotecnológica pela bactéria *Pseudomonas fluorescences* (CUEVAS e FRANCESCH, 2009).

1.3 *Protopalythoa variabilis*

A espécie *Protopalythoa variabilis*, Duerden, 1898 (Figura 6), pertence ao filo Cnidaria, classe Anthozoa e ordem Zoanthidae, com extensa ocorrência nas zonas tropicais, sendo habitante comum de recifes (HICKMAN, ROBERTS e LARSON, 2004). Possui pólipos separados, apenas conectados por um fino cenênquima basal, colunas dos pólipos extensas (até 3,0 cm), coloração da coluna marrom-clara e do disco oral marrom-escuro ou esverdeado (DUERDEN, 1902).

Figura 6 – Fotografias de colônias do zoantídeo *Protopalythoa variabilis* encontrados na costa cearense. A) colônia submersa com pólipos abertos e B) colônia exposta ao ar com pólipos fechados durante a maré baixa. Fotos: Diego V. Wilke.



LIMA (2004) demonstrou uma potente e promissora atividade citotóxica para diferentes linhagens de células tumorais dos extratos hidroalcoólicos brutos de zoantídeos dos gêneros *Protopalythoa* e *Palythoa* coletados na praia de Paracuru, estado do Ceará. Mais recentemente, WILKE et al. (2009) obtiveram uma mistura de dois α -aminoácidos lipídicos (AALs) inéditos a partir de um fracionamento bioguiado pela atividade citotóxica do zoantídeo *Protopalythoa variabilis*. Esse foi o primeiro registro tanto da obtenção de AALs de uma fonte natural, como de seu potencial citotóxico. Estudos adicionais com AALs de *P. variabilis* demonstraram o efeito apoptótico em uma linhagem de leucemia promielocítica (WILKE et al., 2010). Apesar de promissores, o prosseguimento dos estudos foi comprometido devido a um problema recorrente no estudo de produtos naturais obtidos de invertebrados marinhos, a dificuldade na obtenção de compostos ativos em quantidade suficiente.

1.4 Microrganismos associados

Cada vez mais admite-se que a capacidade de biosintetizar uma grande diversidade de metabólitos não é uma característica intrínseca de animais como esponjas, cnidários ou ascídias, mas sim uma atividade própria de microrganismos a eles associados (RADJASA et al., 2011). Uma das substâncias antitumorais mais promissoras, a Briostatina-1, inicialmente isolada do briozoário *Bugula neritina*, teve todas as tentativas de síntese química e produção por maricultura inviáveis. Foi a descoberta de que o gene responsável pela biossíntese desta família de compostos pertencia a uma bactéria associada ao invertebrado, e não ao próprio, que abriu novas possibilidades para a síntese biotecnológica de pelo menos 20 briostatinas conhecidas atualmente. A Briostatina-1 está em fase I e II de teste clínico como droga anticâncer e anti-Alzheimer (IMHOFF, LABES e WIESE, 2011).

Também foi observado que bactérias em associação com poríferos produzem compostos similares aos isolados anteriormente da esponja, como por exemplo, o composto 2-metiltio, 1,4-naphtoquinona que foi isolado de bactérias associadas à esponja *Dysidea avara* e demonstrou forte propriedade anti-angiogênica e antimicrobiana (BRINGMANN et al., 2007).

A grande dificuldade na obtenção de produtos naturais marinhos para testes pré-clínicos e clínicos deve-se ao rendimento extremamente reduzido dos extratos de invertebrados do ambiente natural, o que pode inviabilizar a produção sustentável

quando um composto desses for proposto ao mercado como um fármaco. A produção de compostos por fermentação figura como uma alternativa altamente conveniente para superar esse obstáculo (PROKSCH *et al.*, 2003).

Os microrganismos marinhos desenvolveram um aparato metabólico bastante peculiar que é, de certo modo, muito mais promíscuo que o de seres multicelulares. Essa característica lhes confere uma enorme capacidade adaptativa, o que garantiu a sua sobrevivência em ambientes às vezes extremos, e favoreceu a produção de metabólitos nunca antes observados para organismos terrestres (ZHANG *et al.*, 2005). Entre os protótipos de fármacos obtidos de microrganismos marinhos, destacam-se a salinosporamida A (Marizomib®; NPI-0052), e plinabulina (NPI-2358), ambas em testes clínicos para o tratamento do câncer.

A plinabulina é uma dicetopiperazina análoga sintética, inspirada na halimida (NPI-2350), um produto natural obtido do fungo marinho *Aspergillus sp.*, isolado da associação com a alga *Halimeda copiosa* (RATEB e EBEL, 2011). Vem sendo desenvolvida pela Nereus Pharmaceutical Inc, e atualmente encontra-se em fase II de teste clínico para pacientes com câncer de pulmão avançado, e em fase I para tumores sólidos e linfomas (IMHOFF, LABES e WIESE, 2011). Esta substância liga-se com a β -tubulina solúvel no citosol impedindo a sua polimerização. Os estudos *in vivo* determinaram uma notória seletividade para células endoteliais imaturas em proliferação, aquelas responsáveis pela neovascularização essencial para o suprimento de sangue dos tumores sólidos. Bloqueando este suprimento, as células tumorais são levadas a morte por necrose devido a falta de nutrição (Revisado por COSTA-LOTUFO *et al.*, 2009).

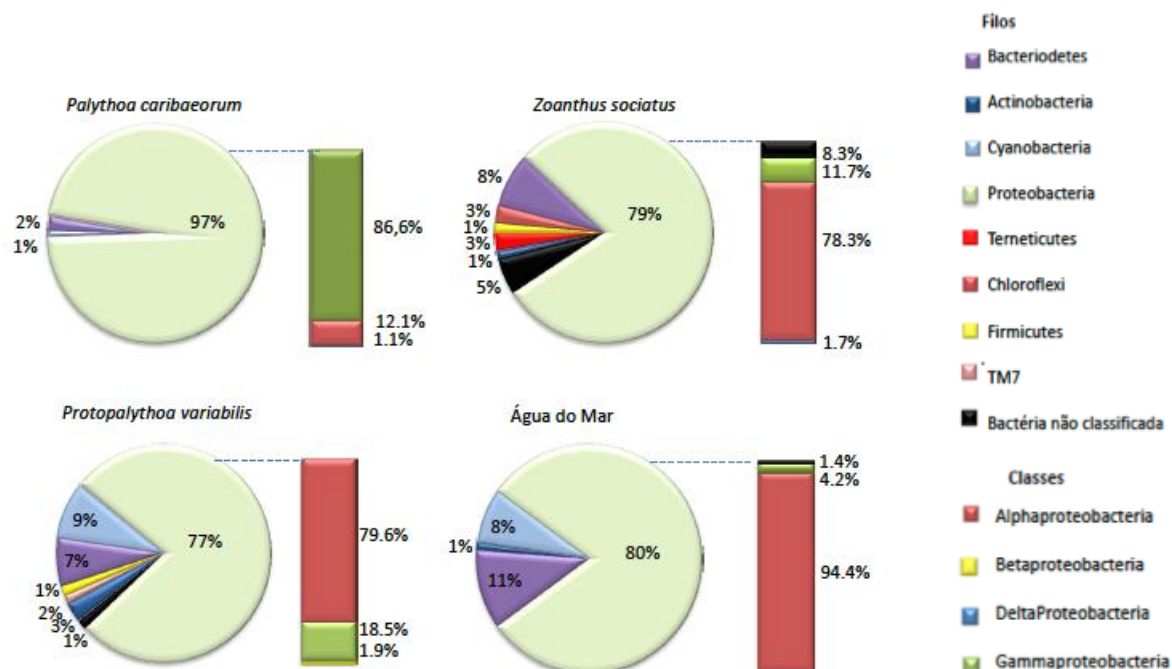
Salinosporamida A (NPI-0052), é uma β -lactona isolada do actinomiceto marinho-restrito *Salinispora tropica*, resgatado do sedimento marinho nas Bahamas. Seu mecanismo de ação consiste em uma potente e seletiva inibição da função catalítica dos proteossomos, estruturas celulares responsáveis pela degradação de proteínas, assim como age o composto bortezomib (Velcade®) (FENICAL *et al.*, 2008). A diferença entre os dois compostos diz respeito a velocidade e tempo de ação, notoriamente mais eficaz para salinosporamida A, que, também demonstra grande eficiência contra diversos modelos de neoplasias (OLANO, MÉNDEZ e SALAS, 2009), e ainda, mantêm a eficácia em mielomas de múltiplas células isolados de pacientes refratários ou resistentes ao bortezomib, lenalidomida e/ou talidomida. O rendimento da fermentação, através de técnicas aperfeiçoadas para *S.*

tropica, podem resultar em até 450 mg de salinosporamida A por litro de meio de cultura, com grau de pureza maior que 98% (JENSEN, GONTANG, et al., 2005). Por ser uma molécula simples, com baixo peso molecular (313) e densa funcionalidade, muitos químicos orgânicos sintéticos despertaram o seu interesse para elucidar estratégias de síntese total. Todavia, foi o próprio produto natural que ingressou para os testes clínicos, e, até o momento, a fermentação continua sendo o método mais eficiente e robusto para a produção de salinosporamida A (COSTA-LOTUFO et al, 2009; FENICAL et al., 2008).

Os actinomicetos são um grupo de bactérias Gram-positivas que frequentemente possuem organização filamentosa, conhecidas pela sua insuperável capacidade de produzir metabólitos secundários com diversas atividades biológicas (ZOTCHEV, 2011). Ao que parece, as actinobactérias estão amplamente distribuídas pelo oceano, tendo sido encontradas em zonas intertidais, na coluna d'água, em associação com animais e plantas e no sedimento oceânico. Incluem membros dos gêneros *Dietzia*, *Rhododoccus*, *Streptomyces* e, recentemente descobertos, os gêneros *Salinispora* e *Marinispora*, ambos dos quais necessitam de água do mar para se proliferarem (JENSEN, MINCER, et al., 2005). A descoberta de diversos novos actinomicetos marinhos com atividades metabólicas únicas, habilidade em formar populações estáveis em diferentes habitats e a capacidade de produzir novos compostos com várias atividades biológicas, claramente ilustra que estes microrganismos marinhos são uma importante fonte de novos metabólitos secundários (revisão de SUBRAMANI e AALBERSBERG, 2012).

Um trabalho desenvolvido recentemente por pesquisadores da Universidade Federal do Ceará (UFC), estudou a estrutura da comunidade bacteriana de zoantídeos coletados na praia do Paracuru. A maior diversidade de genoma bacteriano foi relatada para o zoantídeo *P. Variabilis* (77% Proteobactérias; 9% Cyanobactérias; 7% Bacteriodetes; 3% Actinobactéria; 2% TM7; 1% Firmicutes; 1% Bactéria não classificável), quando comparada com as populações encontradas para *Palythoa caribaeorum* (97% Proteobactérias; 2% Bacteriodetes; 1% Cyanobactérias), e com a análise feita para a coluna d'água (80% Proteobactéria; 11% Bacteriodetes; 8% Cyanobacteria; 1% Actinobactéria) (figura 7) (RABELO, 2012).

Figura 7 – Diversidade e estrutura das comunidades bacterianas associadas aos zoantídeos *P. caribaeorum*, *Z. sociatus*, *P. variabilis* e água do mar, coletados na praia do Paracuru, estado do Ceará. (Adaptado de RABELO, 2012).



A diversidade da microbiota associada a invertebrados varia em função de diversos fatores, entre os quais se destacam a espécie hospedeira e as condições ambientais (RADJASA et al., 2011). Considerando os fortes indícios de que os microrganismos associados sejam os verdadeiros responsáveis pelo elaborado arsenal de metabólitos secundários isolados de invertebrados marinhos, e que os resultados dos estudos prévios embasam o promissor potencial químico e farmacológico do zoantídeo *P. variabilis*, surgiu o interesse em estudar o potencial biomédico da sua microbiota associada.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial citotóxico de metabólitos oriundos da microbiota associada ao zoantídeo *Protopalythoa variabilis* encontrado no litoral oeste cearense.

2.2 Objetivos específicos

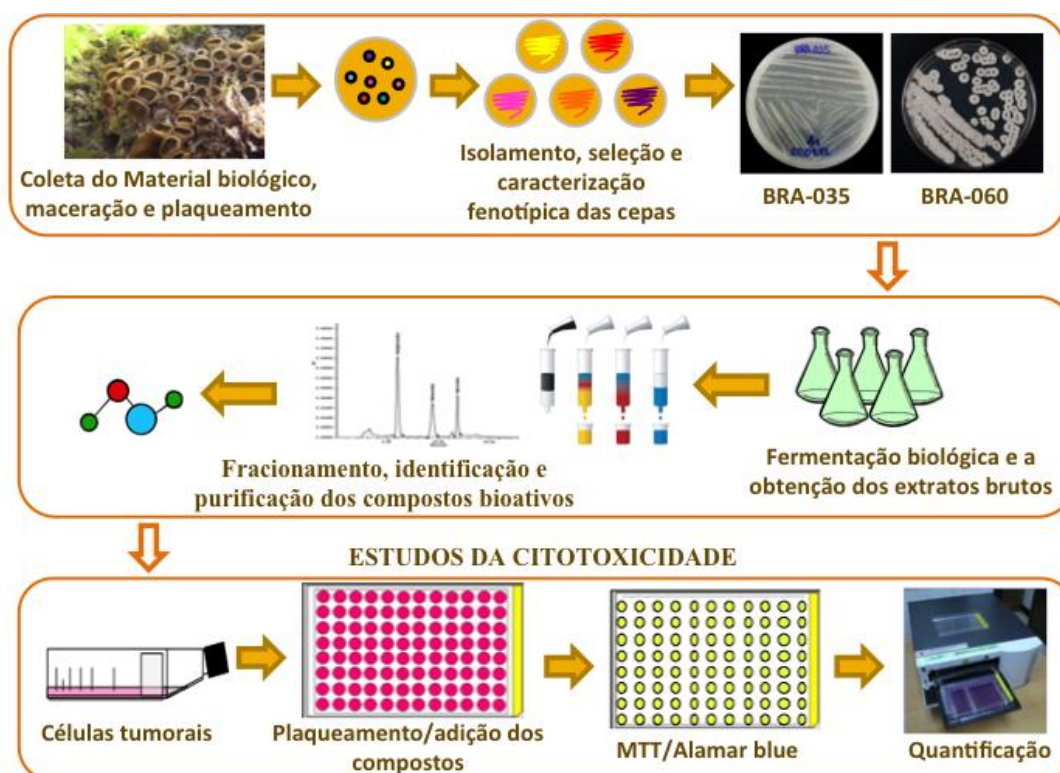
- Cultivar diferentes gêneros de microorganismos associados ao *P. variabilis* para a produção de fermentados biológicos;
- Realizar a fermentação dos microrganismos isolados, extração orgânica dos respectivos caldos de cultura e avaliação do potencial citotóxico dos extratos e melhores condições de cultivo;
- Realizar purificação e caracterização química das substâncias citotóxicas dos extratos selecionados, utilizando diferentes técnicas cromatográficas;
- Avaliar a atividade citotóxica *in vitro* das substâncias obtidas em diferentes linhagens de células humanas tumorais.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Desenho experimental

O desenho experimental (Figura 8) do trabalho consistiu na coleta dos zoantídeos, seguido do isolamento dos seus microrganismos associados. As cepas isoladas passaram por processo de fermentação e extração com acetato de etila (AcEOt). A avaliação da citotoxicidade em células tumorais foi feita para triar os extratos ativos. A partir da seleção das cepas com extratos mais ativos, foi realizada a fermentação em grande quantidade para o isolamento dos compostos ativos presentes nos extratos. A atividade citotóxica dos compostos ativos foi, então, estudados em diferentes linhagens de células tumorais.

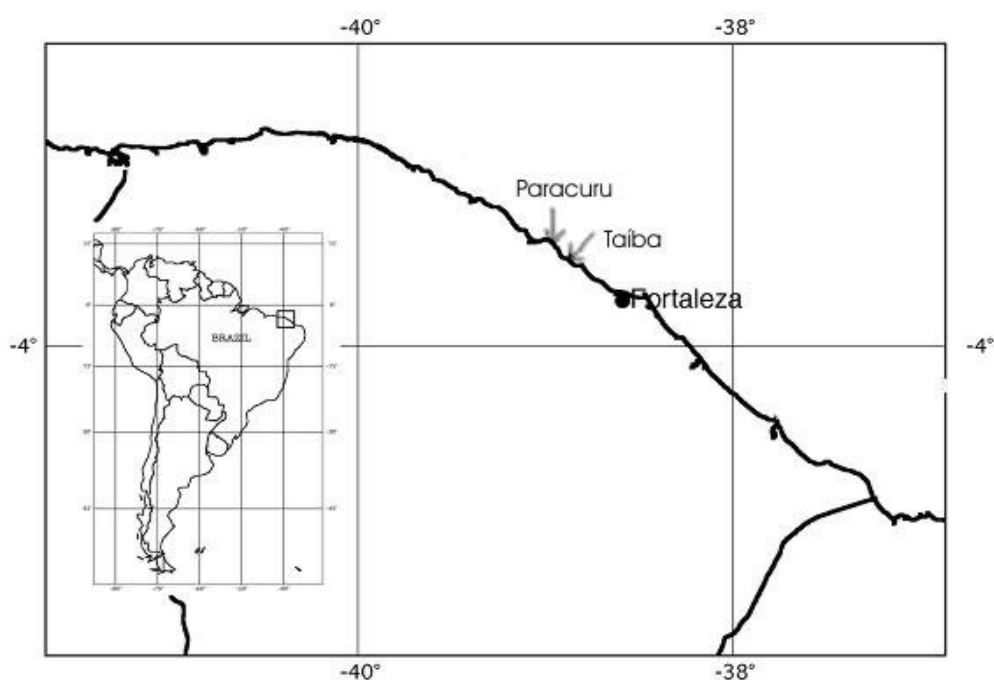
Figura 8 – Desenho experimental do presente trabalho.



3.2 Coleta dos zoantídeos

Os exemplares de *Protopalythoa variabilis* foram coletados no litoral oeste do estado do Ceará, na praia da Taíba (3°30'S, 38°54'O), município de São Gonçalo do Amarante, e na praia da Pedra Rachada (3°23'S, 39°54'O), município de Paracuru (figura 9).

Figura 9 – Mapa de referência indicando os locais de coleta para o invertebrado *Protopalythoa variabilis* na costa cearense.



Cerca de 8 a 12 pólipos foram retirados da colônia com auxílio de pinça e tesoura estéreis. O material passou por uma descontaminação superficial com borrifadas de etanol (EtOH) 70%, e em seguida foi imerso em água do mar estéril, afim de diluir o EtOH e não modificar a microbiota interna do invertebrado. Por fim, o material foi armazenado em um novo frasco contendo água do mar estéril, acomodado em isopor resfriado com gelo e levado para processamento imediato em laboratório. As coletas foram realizadas nos meses de maio e setembro de 2011, em períodos de maré baixa, quando os organismos ficam disponíveis nas formações rochosas fora da coluna d'água.

3.3 Processamento do material

O material coletado foi processado no Laboratório de Ecotoxicologia Marinha do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) da Universidade Federal do Ceará. Dentro de uma câmara de fluxo unidirecional (Filtracom Mini Flow I), os pólipos foram triturados com tesoura até formarem uma pasta densa, que seguiu para banho seco aquecido a 56°C por 5 minutos e posterior incubação em placas de ágar contendo meios de cultura favoráveis ao crescimento de actinomicetos (SCA, SWA e TM, descritos a seguir), através da técnica de esgotamento por estrias.

3.3.1 Meios de cultura sólidos:

- SCA (Starch-Casein Agar): 10g amido solúvel; 1g caseína em pó; 37g preparado de água do mar; 15g de ágar; 1L dH₂O.
- SWA (Sea Water Agar): 18 g de ágar; 1L água do mar filtrada e diluída 75% em dH₂O.
- TMA (Trace Minerals Agar): 0.1g glicose; 0.1g extrato de levedura; 0.5g K₂HPO₄; 0.7g Na₂HPO₄; 0.1g KNO₃; 0.3g NaCl; 0.1g MgSO₄.7H₂O; 0.02g CaCl₂.2H₂O; 18g ágar; 1L água do mar diluída 75% em dH₂O.
- A1: 10g amido solúvel; 4g extrato de levedura; 2g peptona; 18g ágar; 1L água do mar filtrada diluída 75% em dH₂O.

3.3.2 Meios de cultura líquido:

- A1: 10g amido solúvel; 4g extrato de levedura; 2g peptona; 1L água do mar filtrada diluída 75% em dH₂O.
- Marine Broth (BD Difco™): 37,4g do preparado (5g peptona; 19,5g NaCl; 3,24g MgSO₄; 0,55g KCl; 0,1g Fe(OH)₃; 0,034g SrCl₂; 0,004g Na₂(SiO₂); 0,0016g NH₄NO₃; 1,0g extrato de levedura; 5,9g MgCl₂; 1,8g CaCl₂; 0,16g NaHCO₃; 0,08g KBr; 0,022g ácido bórico; 0,0024g NaF; 0,008g NaH₂PO₄); 1L dH₂O.

Todos os meios de cultura passam por esterilização em autoclave à 120°C por 15 minutos. Os meios de cultura ágar foram suplementados com ciclo-hexamida (Sigma) 100µg/ml.

3.4 Isolamento dos microrganismos associados

As placas de ágar ficaram sob observação durante o período de 2 semanas a 3 meses após o processamento do material, o aparecimento de novas colônias foi monitorado diariamente. As colônias foram reconhecidas por suas diferenças fenotípicas (cor, brilho, textura, etc) e separadas/purificadas em meio A1 sólido.

3.4.1 Depósito em banco de bactérias e triagem de bioatividade

Todas as cepas isoladas de *P. variabilis* foram catalogadas (BRA – XXX) e depositadas no banco de bactérias do Laboratório de Ecotoxicologia Marinha, LABOMAR – UFC. Após a isolamento das colônias, as mesmas foram crescidas em 100ml de meio A1 líquido e permaneceram em agitação constante em agitador orbital (~120rpm) por 7 dias. Ao fim deste período, uma alíquota de 10ml do caldo foi separada e distribuída entre 9 frascos criogênicos com capacidade de 2mL contendo glicerol diluído 50% em dH₂O estéril (1:1). Os frascos foram congelados em ultrafreezer a -70°C. Cada cepa recebeu um código estipulado pelo catálogo do laboratório.

Concomitantemente, 90ml de acetato de etila (AcOEt) P.A. foram adicionados ao restante do caldo de cada bactéria, que voltou para agitação por mais 3 horas. A partição AcOEt foi separada e evaporada para a concentração dos extratos brutos. Os extratos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma) a 10 mg/mL para realização dos testes de atividade biológica.

O ensaio do MTT foi empregado para rastrear a atividade apresentada pelos extratos brutos e, durante o procedimento de fracionamento, para rastreamento da atividade biológica das diferentes frações resultantes. Consiste na avaliação do efeito citotóxico através da determinação da porcentagem de células metabolicamente viáveis. Todas as amostras foram testadas em linhagens de células tumorais, em uma única concentração para rastreamento da atividade, e, em diferentes concentrações para determinar a potência das frações ativas. Mais

detalhes desde procedimento, bem como os métodos envolvidos na montagem dos experimentos, estão descritos adiante no item 3.7.2.1.

A partir dos resultados dos ensaios de citotoxicidade com os extratos, duas cepas foram escolhidas para continuação dos estudos e purificação dos compostos ativos, denominadas BRA-035 e BRA-060.

3.4.2 Identificação molecular

O sequenciamento da porção 16S do gene do RNA ribossomal (16S rDNA) é usado para estudos filogenéticos, uma vez que esta região é altamente conservada entre as diferentes espécies de bactérias (WEISBURG et al., 1991). As cepas BRA 035 e BRA 060 foram selecionadas para dar procedimento aos estudos. Para tanto, a identificação molecular de ambas foi realizada pela análise comparativa do 16S rDNA, em banco de dados de sequências biológicas BLAST (do inglês, *Basic Local Alignment Search Tool* - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Para a extração de DNA total foi utilizado o protocolo para extração de DNA genômico bacteriano DNeasy (Kit QIAGEN), e a amplificação por PCR foi realizada utilizando os primers F27 (AGA GTT TGG ATC MTG GCT CAG), e R1492 (CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT), mais um preparado de Taq Polimerase pronto para uso (illustra Ready-To-Go RT-PCR Beads – GE Healthcare Life Sciences). A solução foi purificada (MiniElute PCR Purification Kit – QIAGEN) e enviada para sequenciamento pela empresa Macrogen Inc. Eletroforeses com gel de agarose a 10% foram corridos para confirmar a eficácia da extração de DNA e PCR (80 volts - 50 minutos) e todas as análises para verificar a quantidade de ácidos nucleicos foram feitas por leitura de absorbância pelo espectrofotômetro Nanodrop (NanoDrop 2000c/2000 UV-Vis Spectrophotometers – Thermo Scientific).

3.5. Estudos com BRA-035

3.5.1 Estudo de crescimento bacteriano – relação biomassa e atividade biológica

Com o propósito de melhorar a produção do(s) composto(s) ativo(s), um estudo do crescimento cinético em laboratório da bactéria *Streptomyces sp* (BRA-

035) isolada de *Protopalythoa variabilis* foi realizado. A cepa foi inoculada em 15 erlenmeyers contendo 100ml de meio A1 cada e a extração com acetato de etila (1:1) foi executada em intervalos de 2 dias (0, 2, 4, 6, 8 e 10) em triplicata. Para determinar o peso seco da biomassa de cada dia, 10 mL de cultura foram centrifugados, em seguida lavados com água destilada e novamente centrifugados por 5 minutos a 5.000 rpm. O material foi liofilizado e pesado em balança analítica de precisão. Juntamente com a determinação da biomassa, foi feita a análise da atividade citotóxica dos extratos obtidos para cada dia, em células PC-3/M através do ensaio do MTT, descrito no item 3.7.2.1. O resultado obtido com esse experimento guiou o tempo ideal do cultivo da cepa utilizada neste trabalho para obter extratos com maior potência citotóxica.

3.5.2 Fermentação em larga escala

O extrato bruto foi obtido através da fermentação em larga escala da cepa selecionada para estudo. Inicialmente, a bactéria foi retirada da placa de ágar e transferida para um erlenmeyer contendo 100ml de meio A1 com auxílio de alça estéril. Após 3 dias, o meio já continha biomassa suficiente para expandir a cultura para outros 10 erlenmeyers, transferindo 10ml do meio inicial para cada um. Por fim, após mais 2 dias de crescimento, foram transferidos 50ml de meio contendo biomassa da bactéria para 20 erlenmeyers contendo 500ml de meio A1. Todas as etapas de crescimento e fermentação ficaram sob agitação constante à 120 rpm. Após 8 dias de crescimento/fermentação, foram adicionados 550ml de AcOEt P.A (1:1) em cada frasco, seguido de 3 horas de agitação à 200 rpm. A solução foi transferida para funis de separação, afim de separar a fase aquosa. O extrato AcOEt foi evaporado em pressão reduzida a aproximadamente 45°C.

3.5.3 Fracionamento do extrato acetato de etila da cepa BRA 035 (EAcE - 035)

O fracionamento de EAcE - 035 foi feito através de cromatografia líquida de alta performance (CLAE, ou HPLC do inglês – *High Performance Liquid Chromatography*), realizado no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, sob a supervisão da Dra. Otília Pessoa e execução pela Dra. Ana Isabel Vitorino Maia e pelo Msc. Francisco das Chagas Lima Pinto.

Os mecanismos e condições utilizados no CLAE foram: sistema Shimadzu UFLC equipado com SPD-M20A diode array detector de UV-Vis. As separações foram realizadas usando coluna de fase reversa phenomenex® (250 x 4,6 mm, i.d 5 µm). Os solventes usados para as análises consistiram de água (solvente A) e acetonitrila (solvente B) transportados a 35°C, com um volume de injeção (loop) de 200µl e taxa de fluxo de 4,72 mL/min (5-95% A 0-30 minutos e 100% B 30-40 minutos). A faixa de comprimento de onda de varredura do PDA foi ajustada em 190-400nm e os cromatogramas foram registrados entre 210-400nm.

3.5.3.1 Isolamento de piericidinas – determinação estrutural

A identificação do composto P8 e dos compostos presentes na fração F7, isolados através da CLAE, foi realizada através da interpretação dos dados de espectrometria de massa de alta resolução (HR-LC-MS), bem como dos espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio (H^1) e carbono (C^{13})

3.6. Estudos com BRA-060

3.6.1. Fermentação em larga escala

O procedimento de fermentação em larga escala e obtenção do extrato bruto seguiu o procedimento descrito no item 3.5.3. Contudo, o meio de cultura utilizado para o cultivo desta cepa teve de ser modificado, consequência da estratégia escolhida para solucionar a problemática da produção de extrato bruto sem atividade (ver adiante, item 4.4.3). Assim dito, a fermentação em larga escala e obtenção do extrato bruto da cepa BRA 060 foi realizado com o meio de cultura líquido Marine Broth, descrito no item 3.3.2.

3.6.2. Fracionamento do extrato acetato de etíla da cepa BRA 060 (EAcE - 060)

Para o fracionamento de EAcE – 060, um método preliminar ao CLAE foi implementado afim de facilitar o rastreamento das frações e isolamento de substâncias ativas. Aproximadamente 30mg do extrato seco foi solubilizado em

AcOEt/MeOH (1:1) e dispensado em uma coluna (13,5cm) contendo sílica flash para empacotamento (40-63 μ m). Após a evaporação total dos solventes utilizados para solubilizar a amostra, 5mL de uma série de solventes, com diferentes níveis de polaridade, foram adicionados à coluna, um por vez, resultando em frações com polaridades diferentes (tabela 2).

Tabela 2 – Relação proporcional de solventes utilizados para o fracionamento de EAcE – 060. Hex – Hexano; AcOEt – Acetato de Etíla; MeOH – Metanol.

Fração	Solvente
A	Hex – 100%
B	Hex/AcOEt – 2:1
C	Hex/AcOEt – 1:1
D	AcOEt – 100%
E	AcOEt/MeOH – 2:1
F	AcOEt/MeOH – 1:1
G	MeOH – 100%

Após confirmação da fração ativa pelo ensaio do MTT, o extrato bruto total foi fracionado usando a mesma metodologia, solubilizado em uma coluna maior, e 50 mL de cada solvente. A fração escolhida foi separada e seguiu para CLAE, que operou sob as seguintes condições: sistema Shimadzu UFLC equipado com SPD-M20A diode array detector de UV-Vis. As separações foram realizadas usando coluna de fase reversa phenomenex® (250 x 4,6 mm, i.d 5 μ m). A fase móvel foi de um gradiente linear de MeOH/água (5-60%), com taxa de fluxo de 4,72mL/min, por um período de 26 minutos. A faixa de comprimento de onda de varredura do PDA foi ajustada em 190-400nm e os cromatogramas foram registrados entre 215-400nm.

Os procedimentos de separação do extrato da cepa BRA 060 também foram realizados no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, sob a supervisão da Dra. Otília Pessoa e execução pela Dra. Thiciana da Silva Sousa e pelo Msc. Francisco das Chagas Lima Pinto.

3.6.2.1 Isolamento de Dicetopiperazinas – determinação estrutural

A identificação dos compostos Fr4, Fr6 e Fr7, isolados de EAcE-060 E,

através de CLAE, foi realizada através da interpretação dos dados dos espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio (H^1).

3.7. Estudos da atividade biológica

3.7.1 Cultivo de linhagens celulares

Para a verificação de atividade antitumoral *in vitro* dos extratos, frações e substância isolada obtidos neste trabalho, um painel de linhagens celulares tumorais foi utilizado e se encontra detalhado na tabela 3 abaixo. As linhagens foram doadas pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI-USA), ou compradas pela empresa American Type Culture Collection (ATCC). As células foram cultivadas em recipientes de plástico para culturas (Corning, 25cm², volume de 50ml), contendo meio de cultura RPMI 1640 (Gibco) suplementado com soro fetal bovino (10%) e antibióticos (1% - 100UI penicilina / 100µg/ml estreptomicina - Sigma). Todas as culturas foram mantidas em incubadora à 37°C, com atmosfera de CO₂ de 5% e umidade de 95%. Observações diárias foram feitas com auxílio de um microscópio invertido, e manutenções preventivas foram feitas para garantir a saúde e qualidade das culturas. Todos os procedimentos envolvendo o manuseio das células foram realizados em ambiente estéril de câmara de fluxo laminar vertical.

Tabela 3 – Linhagens de células tumorais utilizadas. Codificação da linhagem, tipo histológico, procedência da cultura e quantidade de células por ml para plaqueamento dos experimentos. Todas as linhagens são de origem humana.

Linhagem celular	Tipo histológico	Procedência	Plaqueamento (cél/ml)
PC-3	Câncer de próstata metastático	NCI-USA	5x10 ⁴
PC-3/M	Câncer de próstata metastático	NCI-USA	5x10 ⁴
OVCAR-8	Câncer de ovário	NCI-USA	5x10 ⁴
HCT-116	Câncer colorretal	ATCC	5x10 ⁴
HL-60	Leucemia promielocítica	NCI-USA	2x10 ⁴
K562	Leucemia eritrocítica	NCI-USA	2x10 ⁴
A549	Câncer de pulmão	NCI-USA	5x10 ⁴
NCI-H358	Câncer de pulmão metastático	NCI-USA	1x10 ⁵
SF-295	Glioblastoma	NCI-USA	5x10 ⁴

SF-268	Glioblastoma	NCI-USA	5×10^4
SNB-19	Glioblastoma	NCI-USA	5×10^4

3.7.2 Teste de viabilidade celular

3.7.2.1 Ensaio do MTT

O ensaio do MTT é uma análise colorimétrica indireta, e pode ser utilizado para verificação de citotoxicidade e proliferação celular. Consiste na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H brometo de tetrazólio (MTT – Sigma) que possui cor amarela, em formazan - diferenciado por apresentar coloração púrpura - através da enzima succinil-desidrogenase presente nas mitocôndrias celulares (MOSMANN, 1983). A redução ocorre fora da membrana interna da mitocôndria e provavelmente envolve os nucleotídeos cofatores piridinos NADH e NADPH (BERRIDGE e TAN, 1993). Deste modo, este ensaio quantifica apenas as células que estiverem vivas, ou seja, metabolicamente ativas. A quantificação indireta da porcentagem de células viáveis pode ser mensurada através da medida de intensidade de absorbância.

Procedimento experimental

Todas as células utilizadas neste ensaio foram plaqueadas em multiplacas compostas por 96 poços. A densidade de células foi ajustada para cada linhagem, como demonstrado na tabela 3. Os poços foram tratados com as amostras teste, sempre em duplicata ou triplicata, sendo de uma única concentração de 50µg/mL para triagem ou rastreamento de bioatividade, e em um gradiente de concentrações (0,00032 – 50µg/mL para todas as amostras, e 0,24 – $1,2^{e+07}$ pM para Piericidina A), afim de determinar a concentração inibitória média (CI₅₀) de cada. Grupos controles foram empregados em todos os experimentos, sendo: branco (adição de 200µL de meio de cultivo, sem células), controle negativo (adição da mesma quantidade máxima do veículo de diluição – DMSO, utilizado no experimento), e controle positivo (tratamento com Doxorrubicina (Sigma), 0,00032 – 50µM/mL). Todas as etapas são realizadas sob as mesmas condições de cultivo das linhagens celulares.

Após 21, 45 ou 69 horas (variável de acordo com o experimento) de

incubação na mesma estufa utilizada para cultivo, o meio de cultura dos poços foi retirado e 150µL de solução de MTT à 0,5mg/mL foi adicionado, retornando para incubação em estufa por mais 3 horas. Ao fim do período, o sobrenadante com a solução de MTT foi desprezado e o precipitado diluído em 150µL de DMSO. As medidas de absorbância foram mensuradas por espectrofotômetro de placa (DTX-880, Beckman Coulter), no comprimento de onda de 595nm.

A preparação das células para plaqueamento e manuseio com solução de MTT varia quanto em relação a adesão da linhagem nas garrafas de cultura e/ou placa de teste. Para células aderidas, inicialmente, é necessário a quebra da matriz de adesão para que as células entrem em solução e sejam distribuídas entre as cavidades da placa de teste. Em situações como esta, o uso de 1mL de Tripsina-EDTA 1X (Gibco) seguido de 3 minutos de incubação à 37°C, foi utilizado para soltura das mesmas. Após plaqueamento, um período de aproximadamente 24 horas antes do tratamento foi empregado para que as células pudessem aderir ao fundo dos poços. No caso de células em suspensão (HL-60 e K562), se fez necessário etapas de centrifugação para a troca de soluções descritas no experimento, a saber: 1.500rpm por 5 minutos para retirada do meio de cultura; 3.000 rpm por 10 minutos para a retirada da solução de MTT.

Análise dos dados

Os valores da leitura de absorbância foram normalizados utilizando o grupo branco como base 0%, e o grupo controle negativo como 100%. Para análise de inibição do crescimento/proliferação celular, a equação $Y = 100 - Y$ foi aplicada para transformar todos os valores. Nos experimentos em diluições seriadas, os valores de CI_{50} (concentração inibitória média com capacidade de produzir 50% do efeito máximo), bem como intervalos de confiança de 95% (IC 95%), foram determinados através de regressão não linear, gerando curvas de concentração vs. efeito. Todas as análises e gráficos plotados foram realizados pelo programa GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Prism Software).

3.7.2.2 AlamarBlue®

O ensaio realizado com AlamarBlue®, também avalia o efeito antiproliferativo de substâncias testadas em linhagens celulares. Assim como o MTT, este ensaio determina, de forma indireta, o número (porcentagem) de células viáveis, a partir de uma análise colorimétrica. O efeito acontece através da redução do reagente azul **resazurin**, ao composto de cor rósea **resorufin**, pelo metabolismo redox de células metabolicamente ativas (NOCIARI et al, 1998). A inibição do crescimento, mantém o ambiente celular oxidado, e, conseqüentemente, a coloração azul de resazurin (AbD SEROTEC, acessado em fevereiro de 2014).

Foi usado como alternativa para o ensaio do MTT, principalmente em experimentos que utilizaram linhagens celulares suspensas, HL-60 e K562. A principal vantagem na escolha deste teste, é que, diferentemente do MTT, não ocorre a troca do meio onde as células tratadas estão imersas, diminuindo a perda ocasional das mesmas e garantindo resultados com menos interferência.

Procedimento experimental

O plaqueamento das células e tratamento com as amostras segue o mesmo padrão estabelecido neste trabalho para o ensaio do MTT, descrito e caracterizado acima (3.9.1). A contar 3 horas antes do fim do período de incubação com as amostras, 10µL de AlamarBlue® foi adicionado a cada poço. Ao fim das 3 horas que se seguiram, a placa foi lida em espectrofotômetro de placas, em dois comprimentos de onda – 570 e 600nm.

Análise dos dados

Os valores da leitura de absorbância foram normalizados utilizando o grupo branco como base 0%, e o grupo controle negativo como 100%. Para análise de inibição do crescimento/proliferação celular, a equação $Y = 100 - Y$ foi aplicada para transformar todos os valores. Nos experimentos em diluições seriadas, os valores de CI_{50} (concentração inibitória média com capacidade de produzir 50% do efeito máximo), bem como intervalos de confiança de 95% (IC 95%), foram determinados através de regressão não linear, gerando curvas de concentração vs. efeito. Todas as análises e gráficos plotados foram realizados pelo programa GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Prism Software).

4 RESULTADOS

4.1 Obtenção dos microrganismos associados

No total, 10 colônias de bactérias foram isoladas, catalogadas e depositadas no banco de bactérias do laboratório de ecotoxicologia marinha, sendo elas: BRA 035; BRA 036; BRA 045; BRA 046; BRA 060; BRA 061; BRA 063; BRA 078; BRA 106; BRA 107. Deste total, 3 apresentaram características visuais típicas de actinomicetos, formando colônias de aparência seca e rugosa, a saber: BRA 035, BRA 036 e BRA 060. As demais foram classificadas como Gram (-) por formarem colônias leitosas e brilhantes (tabela 4).

Tabela 4 – Colônias isoladas de bactérias associadas ao zoantídeo *P. variabilis*. Detalhamento do seu local de origem, classificação quanto as suas características visuais, e meio de cultura do isolamento inicial.

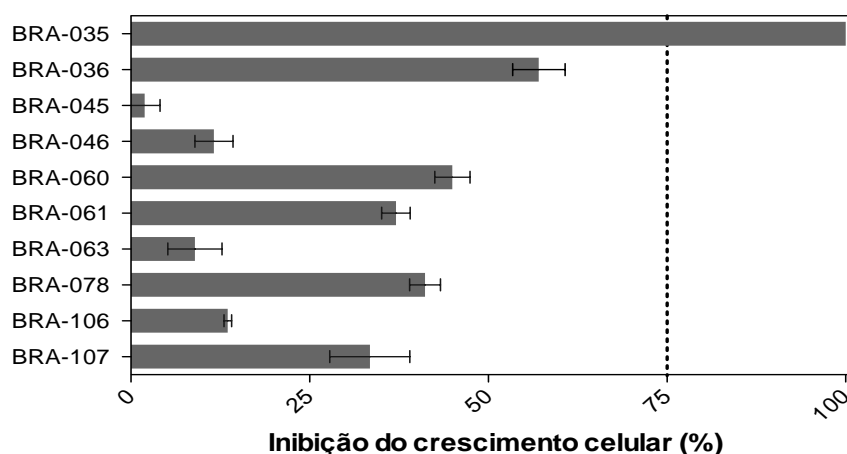
Cepas isoladas	Local de origem <i>P. variabilis</i>	Meio de cultura inicial	Características visuais
BRA 035	Taíba	SCA	Actinomiceto
BRA 036	Taíba	SCA	Actinomiceto
BRA 045	Taíba	SCA	Gram (-)
BRA 046	Taíba	SCA	Gram (-)
BRA 060	Taíba	SWA	Actinomiceto
BRA 061	Taíba	SCA	Gram (-)
BRA 063	Paracuru	TMA	Gram (-)
BRA 078	Paracuru	SCA	Gram (-)
BRA 106	Paracuru	TMA	Gram (-)
BRA 107	Paracuru	TMA	Gram (-)

4.2 Triagem de bioatividade

4.2.1 Análise qualitativa

Os extratos brutos da fermentação de cada cepa foram testados contra a linhagem de célula tumoral PC-3/M (câncer de próstata metastático), em concentração única de 50µg/mL. Após 72h de incubação, o ensaio colorimétrico antiproliferativo (MTT) revelou que BRA 035 inibiu 100% do crescimento celular, enquanto que os extratos das demais cepas não alcançaram a marca de 75% de inibição contra esta linhagem (figura 10). Sendo assim, BRA 035 foi selecionada para dar procedimento aos estudos. As cepas BRA-036 e BRA-060 seguiram como as próximas mais ativas, mas optou-se por trabalhar com BRA-060 que como demonstrado mais adiante (item 4.4.1) inibiu 100% da proliferação das linhagens de cólon HCT-116 e leucemia HL-60.

Figura 10 – Percentual de inibição do crescimento da linhagem de câncer de próstata metastático (PC-3/M) após 72h de incubação com 50 µg/mL dos extratos obtidos das colônias isoladas de *Protopythoa variabilis*.



4.3 Estudos com BRA 035

4.3.1 Estudo do perfil de atividade citotóxica do extrato bruto da BRA-035

O extrato AcOEt de BRA 035 foi testado em diferentes concentrações (0,00032 – 50µg/mL), contra PC-3/M, A549 (câncer de pulmão), NCI-H358/M (câncer de pulmão metastático), SNB-19 (glioblastoma) e SF-268 (glioblastoma), afim de determinar a concentração inibitória média (CI₅₀) e intervalo de confiança de 95% (IC95%) para cada uma (tabela 5). Foi observada atividade seletiva em 3 linhagens, A549, NCI-H358/M e PC-3/M, sendo que, nesta última, a atividade foi mais potente, com valor de CI₅₀ de 0,48 x 10⁻³ µg/mL. Por outro lado, o extrato não apresentou atividade para as linhagens de glioblastoma (CI₅₀ > 50µg/mL).

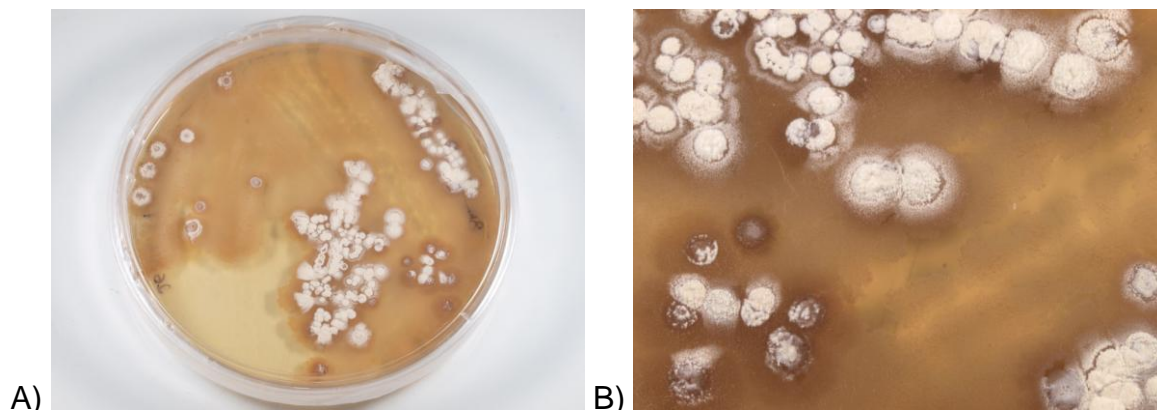
Tabela 5 – Concentração inibitória média (CI₅₀) do extrato acetato-etílico de BRA 035 testados em diferentes concentrações (0,00032 à 50µg/mL) e incubado por 72 horas em diferentes linhagens tumorais celulares. CI₅₀ (µg/mL) e IC95% obtidas através de regressão não linear.

Linhagem celular	CI ₅₀ µg/mL	IC95% µg/mL
PC-3/M	0,48 x 10 ⁻³	0,1 x 10 ⁻³ – 2.2 x 10 ⁻³
A549	15,3	7,8 – 29,2
NCI-H358	6,4	1,7 – 23,4
SNB-19	> 50	--
SF-268	> 50	--

4.3.2 Caracterização visual e identificação molecular da cepa BRA 035

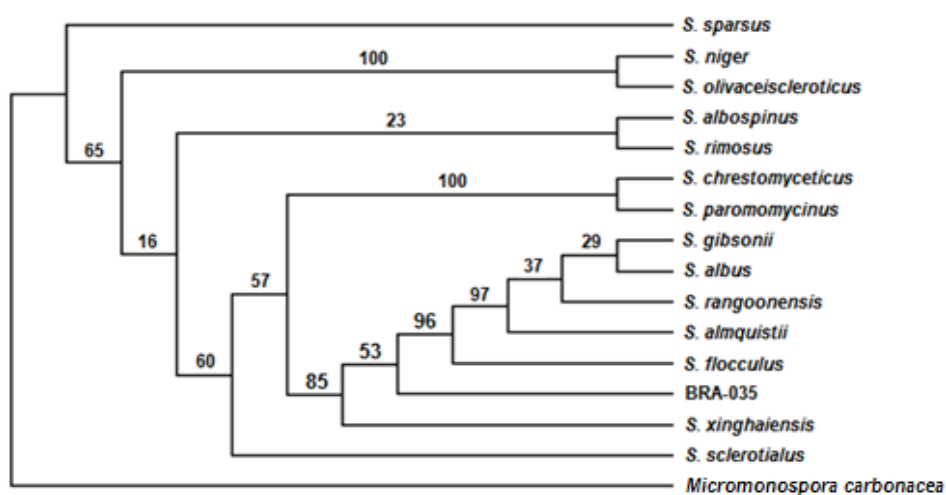
Este item caracteriza de forma visual as principais feições da colônia observada durante o seu cultivo em condições do Laboratório de Ecotoxicologia Marinha da Universidade Federal do Ceará. A figura 11 mostra a cepa em placa contendo meio ágar, sua aparência seca e rugosa é um indicativo consistente que classifica esta como membro pertencente ao grupo dos actinomicetos. Pode-se observar ainda, a formação de esporos de cor branca cobrindo toda a colônia que possui coloração bege amarronzada, evidenciado na figura 11 B.

Figura 11 – Imagens das colônias formadas por BRA 035 em placa de ágar contendo meio A1. A) Imagem panorâmica; B) Imagem evidenciando a formação de esporos de coloração branca. Fotos: Tito M. C. Lotufo.



Através do sequenciamento da região 16S do rDNA e análise no banco de dados BLAST - NCBI, foi determinado que BRA 035 é pertencente ao gênero *Streptomyces*, sendo então identificada como ***Streptomyces sp*** (figura 12).

Figura 12 – Cladograma de agrupamento para BRA 035. Método Maximum likelihood – RaxML.

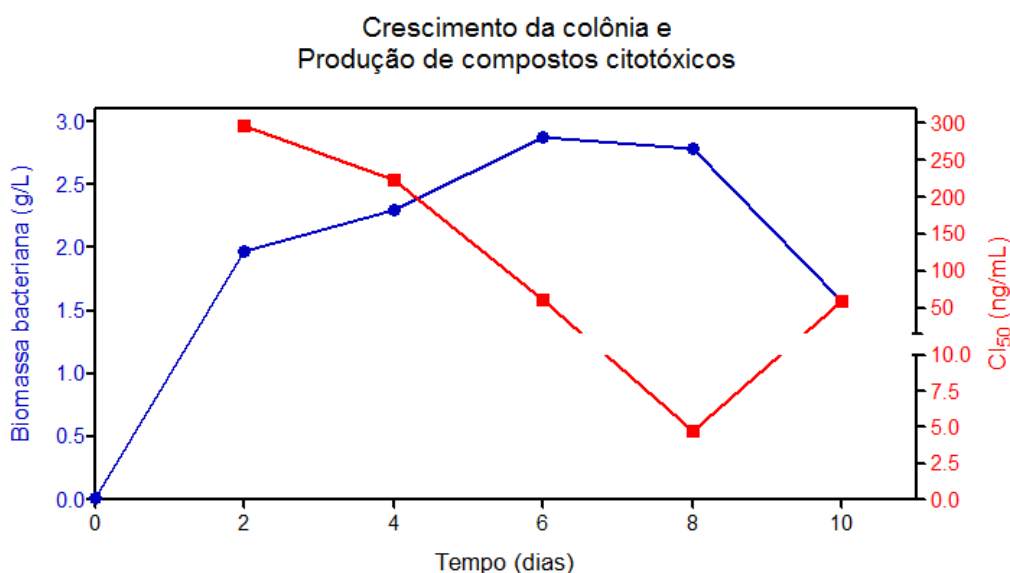


4.3.3 Estudo do tempo de cultivo e relação com a biomassa e atividade biológica da cepa BRA 035

Afim de estipular o melhor tempo de cultivo para obtenção do extrato mais potente, um estudo cinético do crescimento da cepa BRA 035, em condições do laboratório, foi implementado. Na figura 13, pode-se observar o crescimento

exponencial da colônia do dia 0 até o dia 6, quando então o crescimento entra em platô, sendo considerado a fase estacionária. A partir do dia 8 a quantidade de biomassa começa a diminuir, evidenciando degradação da mesma. Um perfil de correlação negativa pode ser observado para os valores de CI_{50} dos extratos, sendo o menor valor encontrado para o dia 8. Por isso, as extrações das fermentações em larga escala desta colônia foram realizadas sempre no 8º dia de crescimento.

Figura 13 – Estudo da correlação da biomassa e atividade citotóxica em função do tempo de cultivo da cepa BRA 035 (*Streptomyces sp* isolada de *P. variabilis*). Correlação negativa entre biomassa e bioatividade. A esquerda, em azul, valores de biomassa (g/L); a direita, em vermelho, valores de bioatividade CI_{50} (ng/mL).

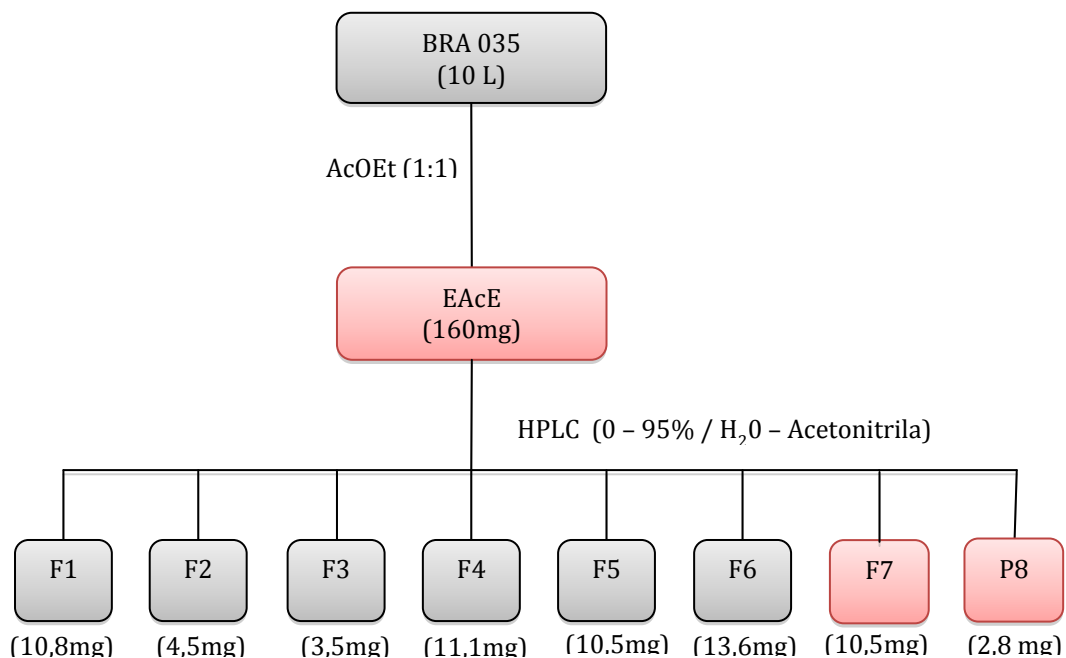


4.3.4 Fracionamento bioguiado BRA 035

O EAcE-035 (10L) foi filtrado e concentrado sob pressão reduzida, somando 150mg de extrato bruto resultante, o qual demonstrou atividade citotóxica contra a linhagem de células PC-3/M. Este extrato ativo foi fracionado por cromatografia líquida de alta performance (CLAE), usando um sistema de o qual originou sete frações principais, F1 – F8 (figura 14). Após nova injeção em CLAE, a fração 8 mostrou alto grau de pureza, e foi denominada P8 (figura 15).

Figura 14 – A) Fluxograma de fracionamento do extrato bruto da BRA-035 (em vermelho – frações ativas). B) Cromatograma CLAE de fase reversa do extrato EAcE de *Streptomyces sp.* Gradiente linear acetonitrila/água 5-95%, taxa de fluxo de 4.72mL/minuto por um período de 30 minutos.

A)



B)

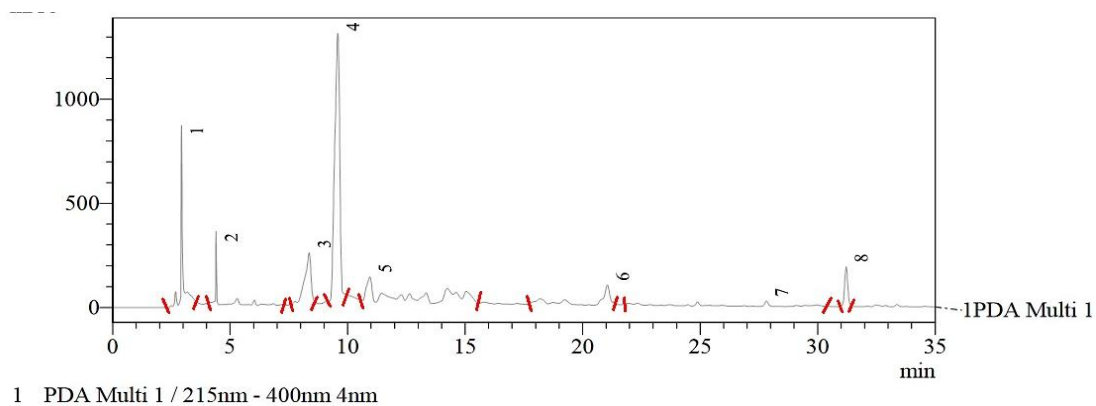
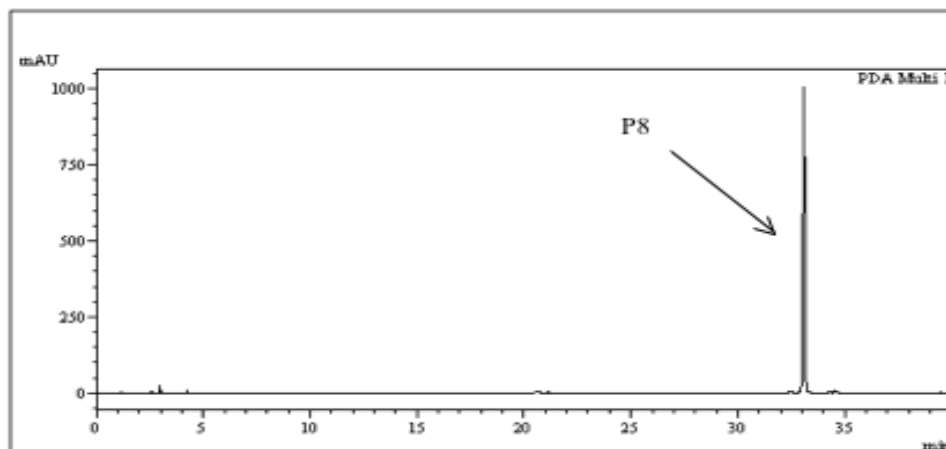


Figura 15 – Cromatograma HPLC de fase reversa da fração P8, comprovando sua pureza.



O potencial citotóxico de cada fração foi avaliado. F7 (10,5mg) e P8 (2,3mg) foram ativos, revelando CI_{50} de 47ng/mL e <16ng/mL, respectivamente (tabela 6).

Tabela 6 – Atividade citotóxica do fracionamento do extrato bruto de BRA 035 contra PC-3/M por 72 horas de incubação. CI_{50} obtida através de regressão não linear.

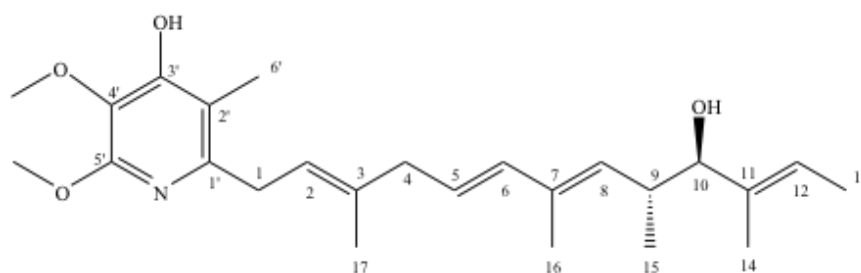
Amostra	CI_{50} ng/mL (IC95%)	Amostra	CI_{50} ng/mL (IC95%)
Extrato BRA 035	0,48 (1,1 – 2,2)	F5	> 50000 (--)
F1	> 50000 (--)	F6	> 50000 (--)
F2	> 50000 (--)	F7	47 (23 – 94)
F3	> 50000 (--)	P8	< 16 (--)
F4	> 50000 (--)		

4.3.5 Identificação dos compostos presentes nas frações “F7” e “P8”

O espectro HR-ESI-MS exibiu um íon *quasimolecular* $[M + H]^+$ em 416.2852 m/z (modo positivo) e em 414.2706 m/z, $[M - H]^-$ (modo negativo) (anexo A), indicando o peso molecular de 415.2774. Juntamente com as análises de C^{13} e H^1

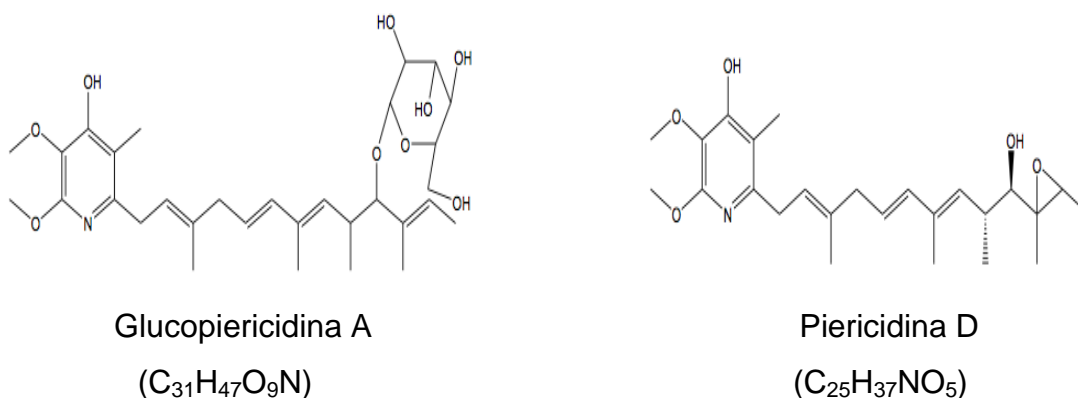
dos dados de ressonância magnética nuclear, a identidade do composto P8 ficou determinada como sendo **Piericidina A** (figura 16, TAMURA, et al., 1963; TAKAHASHI, et al., 1965, YOSHIDA, SHIRAIISHI e TAKAHASHI, 1977). Uma tabela com os dados detalhados das análises estão em anexo B.

Figura 16 – Estrutura química do composto “P8”, identificado como Piericidina A ($C_{25}H_{37}NO_4$) isolado de *Streptomyces sp* (YOSHIDA, SHIRAIISHI e TAKAHASHI, 1977).



A fração F7 também foi analisada por HR-ESI-MS, e revelou a presença de outros dois compostos pertencentes ao grupo das piericidinas: Glucopiericidina (MATSUMOTO, et al., 1987), e Piericidina D (PUBCHEM, 2014 – <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) (Figura 17).

Figura 17 – Estrutura química dos compostos presentes na fração “F7” de EAcE-035. Glucopiericidina A e Piericidina D.



4.3.6 Avaliação da atividade biológica de piericidina A

4.3.6.1 Estudo da citotoxicidade *in vitro*

A CI_{50} de piericidina A foi determinada para as diferentes linhagens celulares listadas na tabela 7 a frente, e comparadas ao quimioterápico Doxorrubicina. A substância apresentou potência altíssima, com CI_{50} na ordem de pM contra as linhagens PC-3/M, OVCAR-8 e HCT-116, e na ordem de nM contra PC-3 e SF-295. Não foi observada atividade para a linhagem leucêmica (HL-60).

Tabela 7 – Atividade citotóxica de Piericidina A isolada de *Streptomyces sp* contra diversas linhagens celulares tumorais, avaliada pelo ensaio do MTT depois do período de 72 horas de incubação. CI_{50} (nM) e IC – 95% determinados por regressão não-linear no programa GraphPad Prism 5.0.

Linhagem	Piericidina A*	Doxorrubicina**
	CI_{50} – nM (IC95%)	CI^{50} – nM (IC95%)
PC-3	9,084 (2,491 – 33,134)	---
PC-3/M	0,0018 (0,00002 – 0,0018)	360 (190 – 690)
OVCAR-8	0,0005 (0,0002 – 0,0013)	470 (310 – 550)
HCT-116	0,1449 (0,0620 – 0,3388)	220 (160 – 310)
SF-295	1,410 (0,947 – 2,123)	440 (360 – 490)
HL-60	>2000	30 (20 – 30)

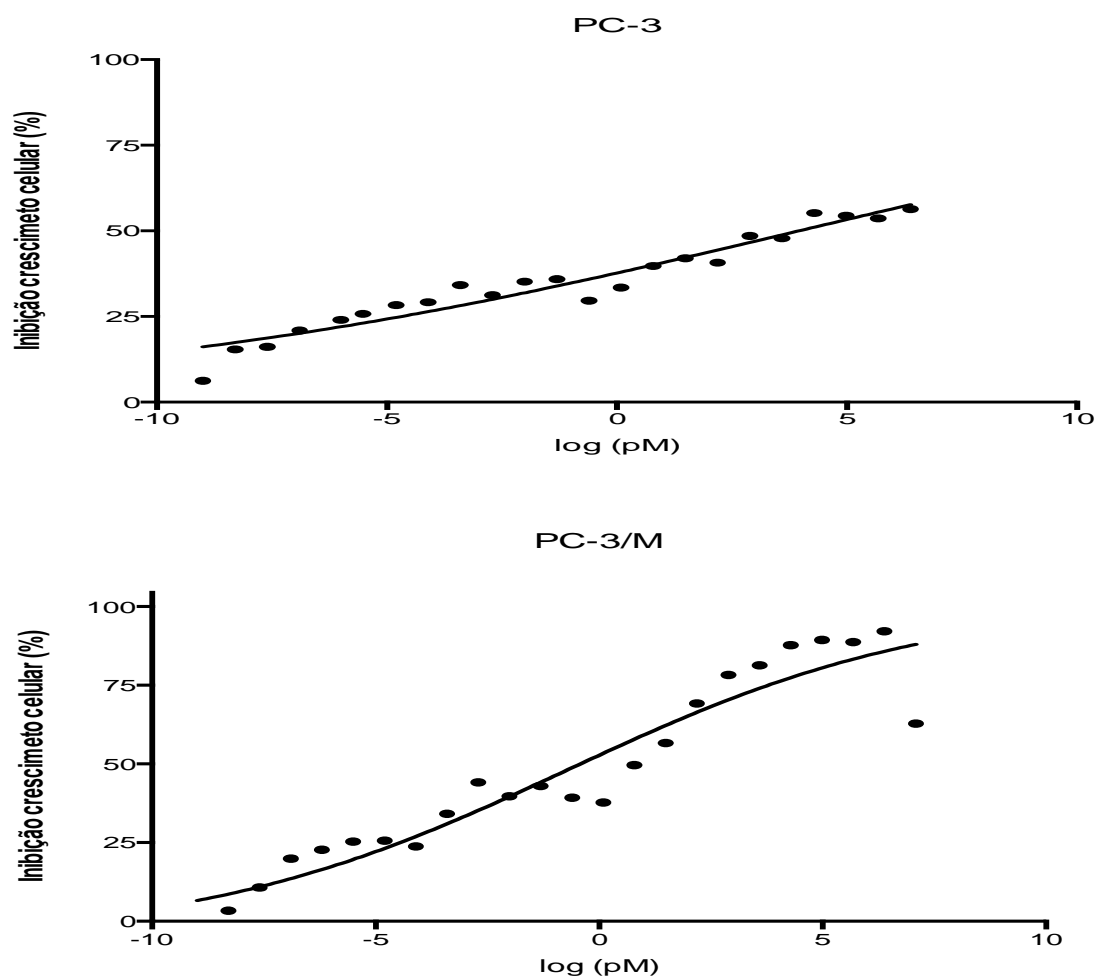
* Massa molecular Piericidina A : 415.2774; **Massa molecular Doxorrubicina: 543,53

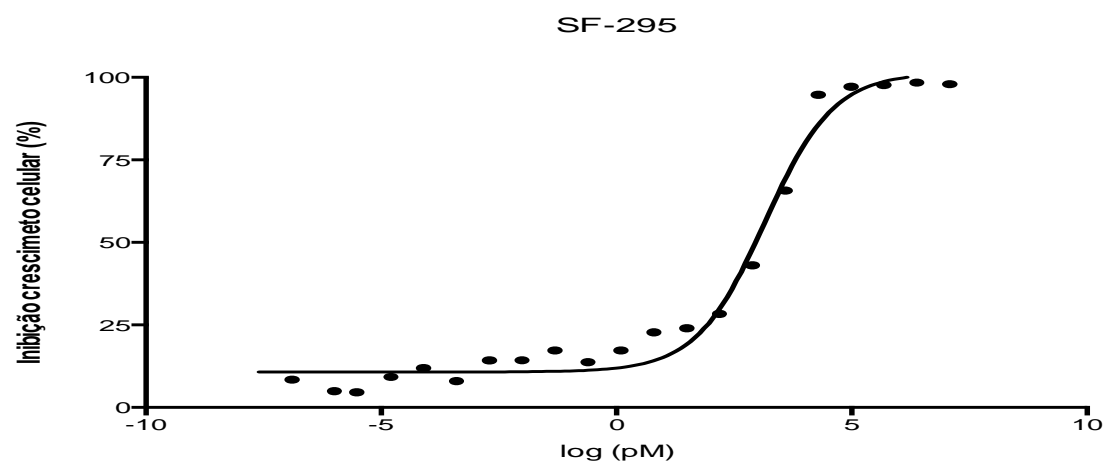
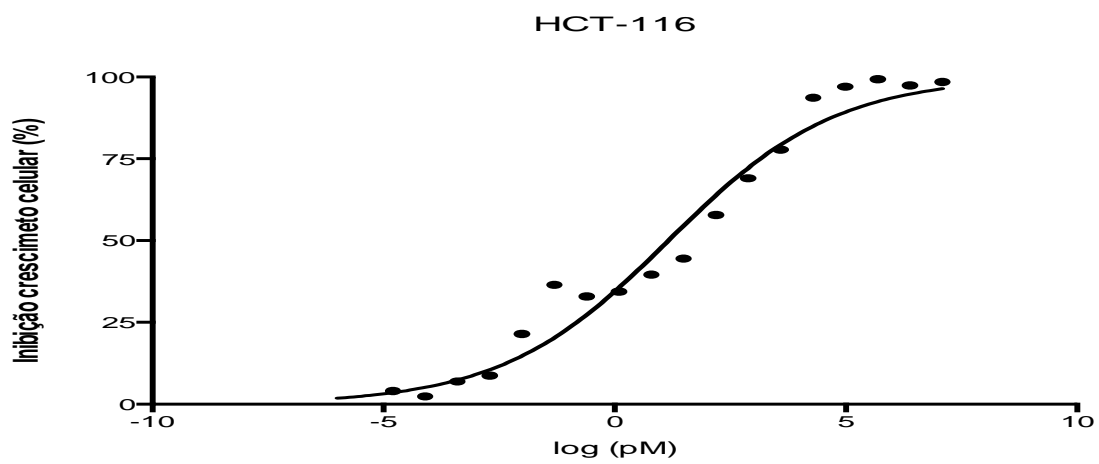
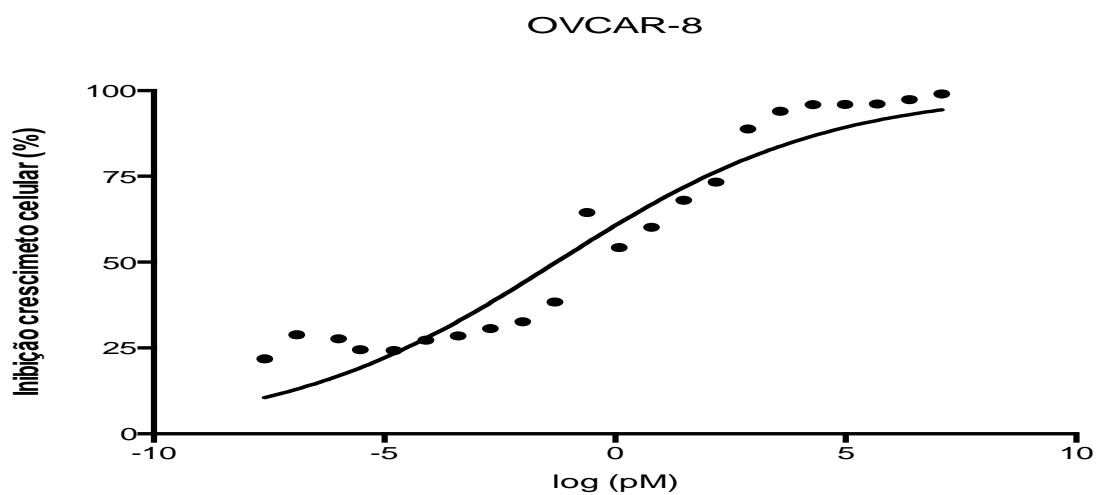
4.3.6.2 Curvas de concentração-efeito

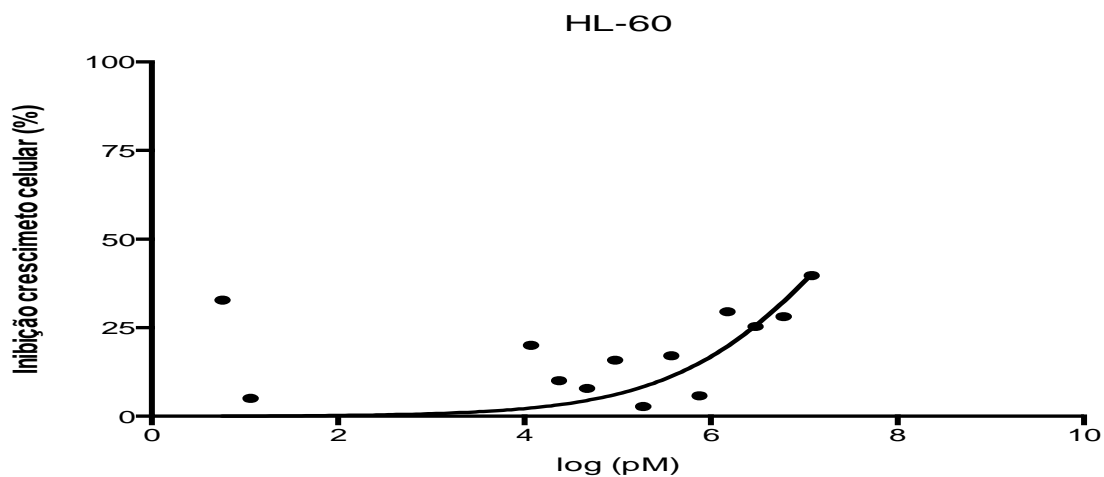
Na figura 18 a frente, estão apresentadas as curvas de concentração-efeito de Piericidina A em todas as linhagens testadas, evidenciando perfis de bioatividade distintos. Pode-se observar um padrão de atividade (distribuição bimodal) em comum para as linhagens mais sensíveis ao seu efeito, PC-3/M, OVCAR-8 e HCT-

116, para PC-3 o mesmo perfil é visível, entretanto, sua potência foi menos pronunciada. As curvas para SF-295 e HL-60 não seguiram um padrão em comum.

Figura 18 – Curvas concentração-efeito de Piericidina A isolada de *Streptomyces sp* sobre as linhagens celulares PC-3, PC-3/M, OVCAR-8, HCT-116, SF-295 e HL-60, avaliadas pelo ensaio do MTT após 72 horas de incubação.

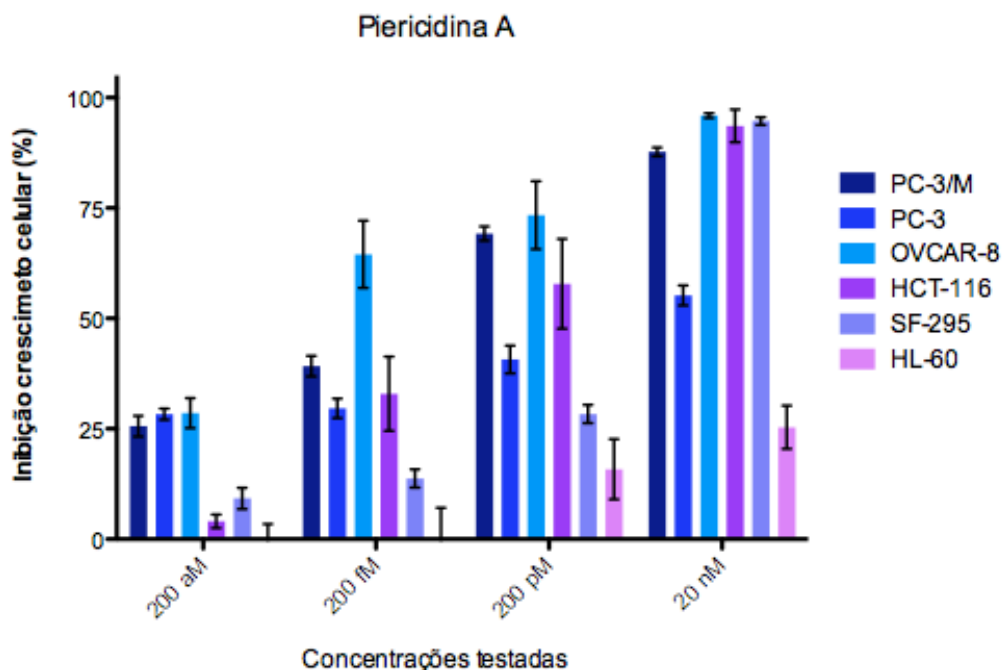






Para comparar melhor o perfil de inibição do crescimento celular da Piericidina A, foi plotado um gráfico contendo a média de inibição no mesmo ponto (concentração testada) de cada curva (figura 19). As concentrações escolhidas correspondem às inibições nas faixas de aproximadamente 25% (200aM), 50% (200fM), 75% (200pM) e 100% (20nM), observadas nas linhagens em que a substância apresentou maior atividade.

Figura 19 – Gráfico mostrando a média de inibição do crescimento celular em 6 linhagens tumorais, de acordo com a concentração testada de Piericidina A, isolada de *Streptomyces sp.* Concentrações escolhidas para análise: 20nM, 200pM, 200fM e 200aM. Gráfico plotado utilizando o programa GraphPad Prism 5.0.

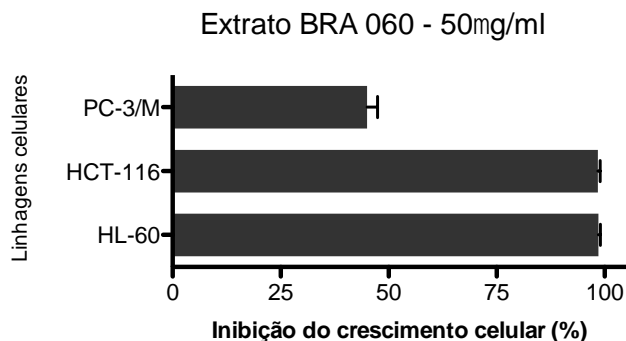


4.4 Estudo com BRA 060

4.4.1 Estudo do perfil de atividade citotóxica do extrato bruto de BRA-060

Apesar de não demonstrar efeito potente sobre a linhagem PC-3/M, o extrato da cepa BRA 060 foi testado contra outras duas linhagens, HCT-116 (carcinoma colorretal) e HL-60 (leucemia promielocítica), em concentração única de 50µg/ml e 72 horas de incubação. Verificou-se atividade citotóxica para ambas, através do ensaio do MTT (Figura 20).

Figura 20 – Percentual de inibição do crescimento celular exercido pelo extrato da cepa BRA 060, contra 3 linhagens tumorais (PC-3/M, HCT-116 e HL-60), à concentração de 50µg/ml, incubado por 72 horas.



O extrato AcOEt de BRA 060 foi então testado em diferentes concentrações (0,00032 – 50µg/mL), contra as linhagens HCT-116 e HL-60, afim de determinar a concentração inibitória média (CI_{50}) e intervalo de confiança de 95% (IC95%) para cada uma (tabela 8). Foi observado menor valor de CI_{50} para a linhagem leucêmica, seguido da linhagem HCT-116, com valores de 0,33 µg/mL e 15,14µg/mL, respectivamente.

Tabela 8 – Concentração inibitória média (CI_{50}) e intervalo de confiança de 95% (IC95%) do extrato acetato de etila da cepa BRA 060 testado em diferentes concentrações (0,00032 à 50µg/mL) e incubado por 72 horas, contra as linhagens HCT-116 e HL-60. Valores obtidos através de regressão não linear.

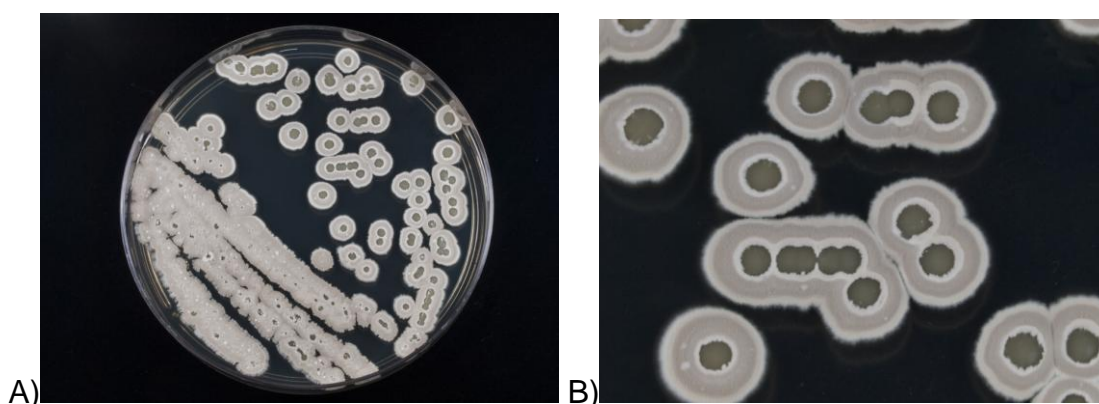
Linhagem celular	CI_{50} µg/ml	IC95% r^2
HCT-116	15,14	9,386 – 24,44 0,9606
HL-60	0,33	0,190 – 4,008 0,7084

4.4.2 Caracterização visual e identificação molecular da cepa BRA 060

Até a presente data, neste trabalho, não foi possível determinar a identificação molecular da cepa BRA 060. Para tanto, este item caracteriza de forma visual as principais feições da colônia observadas durante o seu cultivo em

condições do Laboratório de Ecotoxicologia Marinha da Universidade Federal do Ceará. A figura 21 mostra a cepa em placa contendo meio ágar, sua aparência seca e rugosa é um indicativo consistente que classifica esta como membro pertencente ao grupo dos actinomicetos. Além disso, pode-se observar a produção de esporos ao redor das colônias, de coloração branca e acinzentada, evidenciado na figura 21 B.

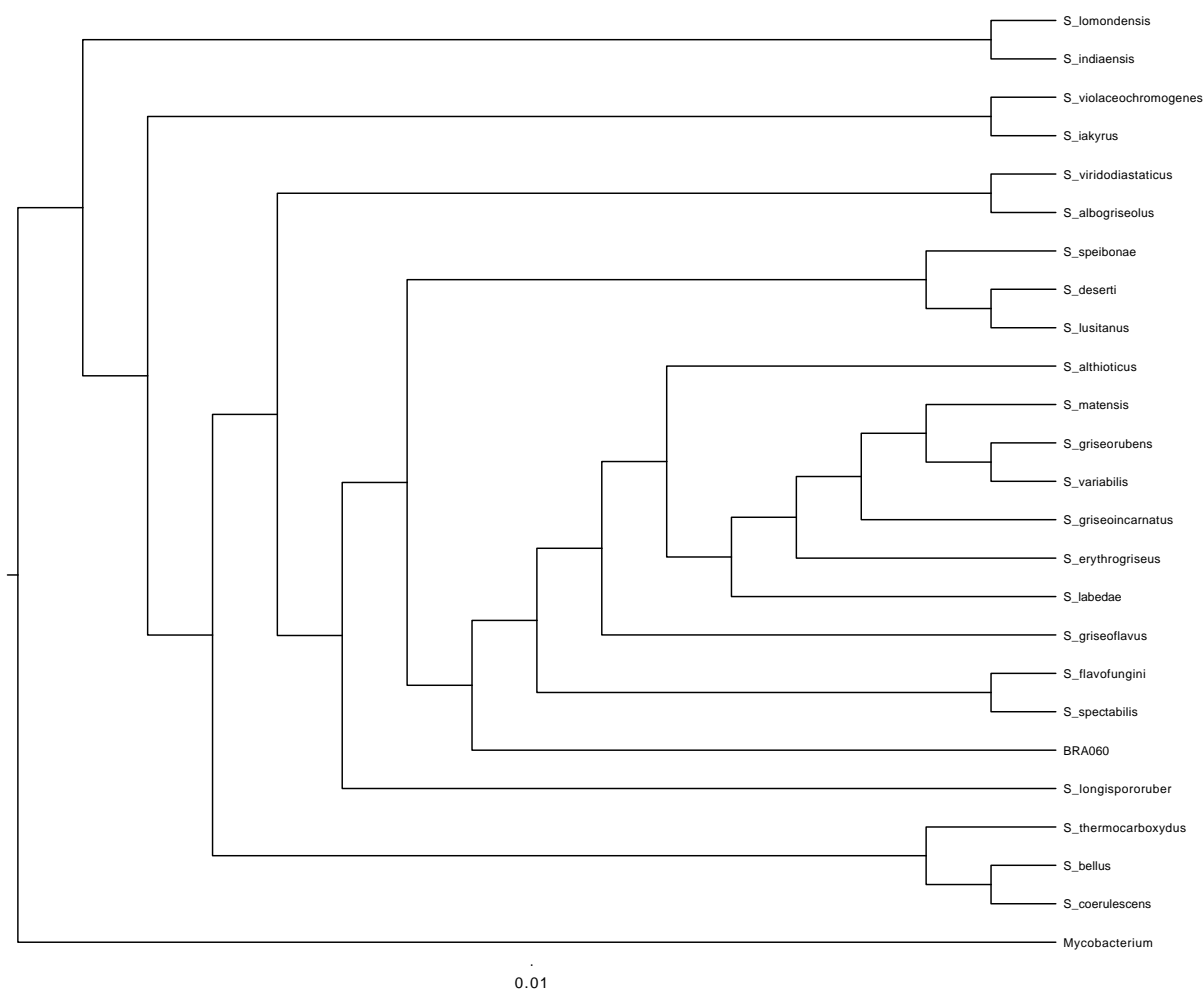
Figura 21 – Colônias de BRA 060 em placa contendo meio ágar. A) Imagem panorâmica; B) Imagem evidenciando a formação de esporos de coloração branca e acinzentada ao redor das colônias. Fotos: Tito M. Lotufo.



Em meio líquido, as colônias apresentaram organização em pequenas circunferências e coloração que variou de creme (quando crescida em meio líquido A1), e amarelada (meio líquido Marine Broth) – Figura 23, adiante.

Através do sequenciamento da região 16S do rDNA e análise no banco de dados BLAST – NCBI, ficou determinado que a cepa BRA 060 é pertencente ao gênero *Streptomyces*, sendo identificada como *Streptomyces sp* (Figura 22).

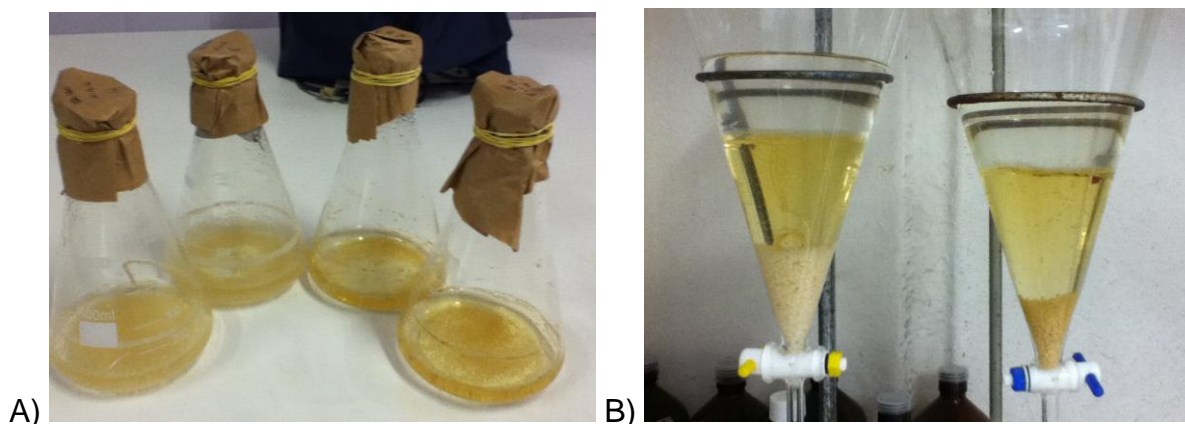
Figura 22 – Cladograma de agrupamento para BRA 060. Método Maximum likelihood – RaxML.



4.4.3. Obtenção do extrato bruto – melhoria da condição de cultivo

Durante o crescimento em larga escala, a cepa BRA 060 resultou na produção de extrato bruto sem atividade ($CI_{50} > 50\mu\text{g/mL}$ em HCT-116), inviabilizando a continuidade do estudo para o fracionamento bioguiado. A estratégia utilizada para este caso foi a troca do meio de cultivo. Um estudo inicial foi feito com inoculo da bactéria em meio A1 e Marine Broth (figura 23). O resultado foi positivo, o extrato resultante da fermentação de BRA 060 em Marine Broth apresentou atividade citotóxica contra a linhagem HCT-116 e HL-60, com CI_{50} de 13,14 e $0,10\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Sendo assim, a produção do extrato bruto em larga escala para a cepa BRA 060 foi efetuada utilizando o meio de cultura Marine Broth.

Figura 23 – Crescimento da cepa BRA 060 em diferentes meios de cultura líquido. A) fermentação em meio A1 à direita, e Marine Broth a esquerda; B) após extração, fases solvente, aquoso e biomassa em funis de separação, à direita meio A1 e à esquerda meio Marine Broth. Fotos: Bianca D. B. Sahm.



4.4.4 Fracionamento bioguiado

O EAcE-060 (10L) foi filtrado e concentrado sob pressão reduzida, somando 252,5mg de extrato bruto resultante, o qual demonstrou atividade citotóxica contra a linhagem de células HCT-116. Este extrato ativo foi fracionado em 8 amostras, diferenciados de acordo com a sua polaridade, através de uma coluna contendo sílica flash. A figura 24 ilustra o procedimento de fracionamento do extrato da BRA-060. Todas as amostras foram testadas às concentrações de 50 e 5 μ g/mL em células HCT-116. As frações E (51,9mg) e F (10,2mg), apresentaram citotoxicidade contra HCT-116, sendo a última menos potente (figura 25). Por tanto, a fração E foi selecionada para dar continuidade ao fracionamento.

Figura 24 – Fluxograma de fracionamento do extrato bruto da BRA-006 (Em vermelho – frações ativas).

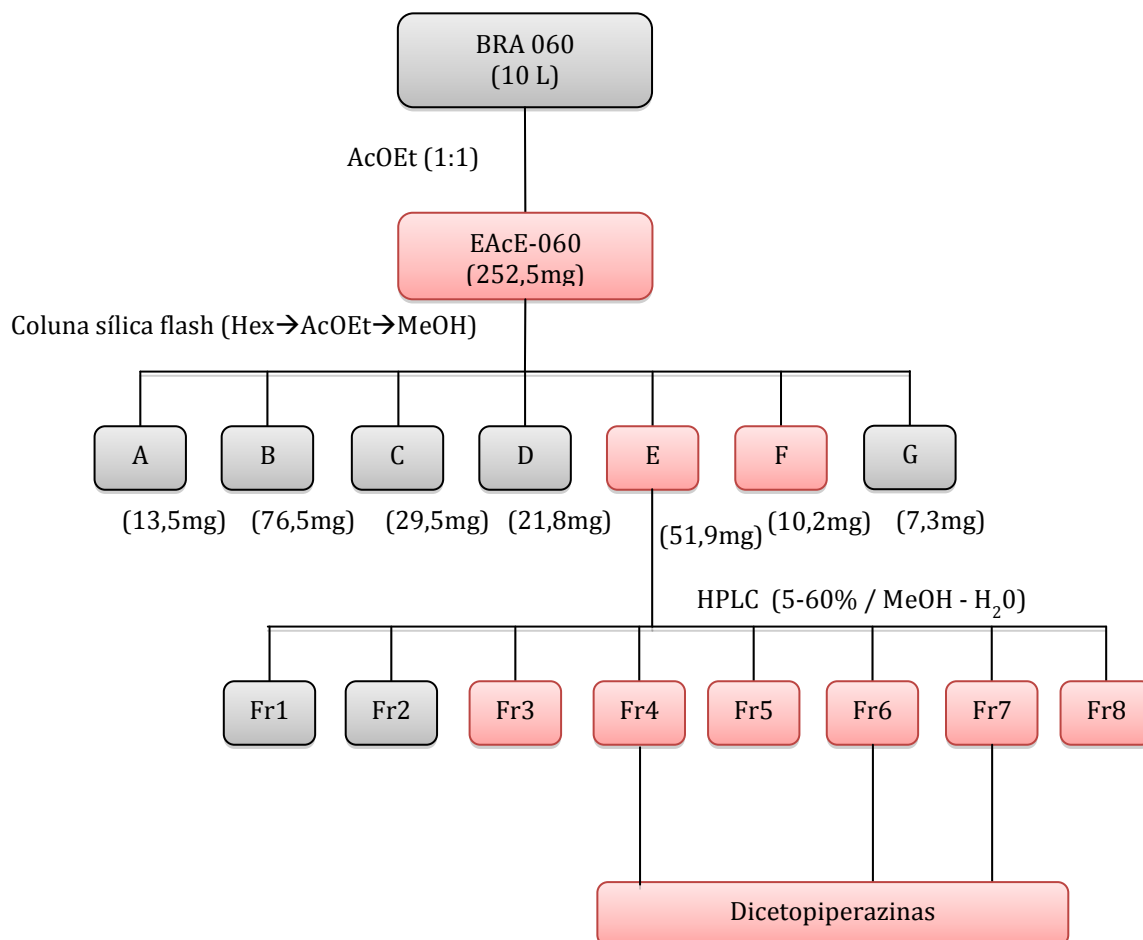
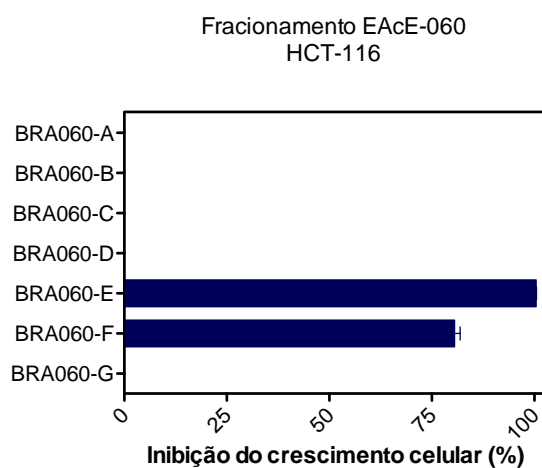


Figura 25 – Atividade citotóxica do primeiro fracionamento de EAcE-060, executado por coluna contendo sílica flash. Linhagem utilizada: HCT-116. Concentração testada: 5µg/mL, 72 horas de incubação.



A partição da fração E foi feita através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), o qual originou oito novas frações (figura 26). Todas as frações foram testadas desta vez contra a linhagem HL-60 e incubação de 48 horas. O ensaio do MTT revelou atividade para 6 das 8 amostras, a saber: Fr3, Fr4, Fr5, Fr6, Fr7 e Fr8, todas com baixos valores de CI_{50} (tabela 9).

Figura 26 – Cromatograma de fase reversa (CLAE) da fração E de EAcE-060, indicando as delimitações das frações obtidas.

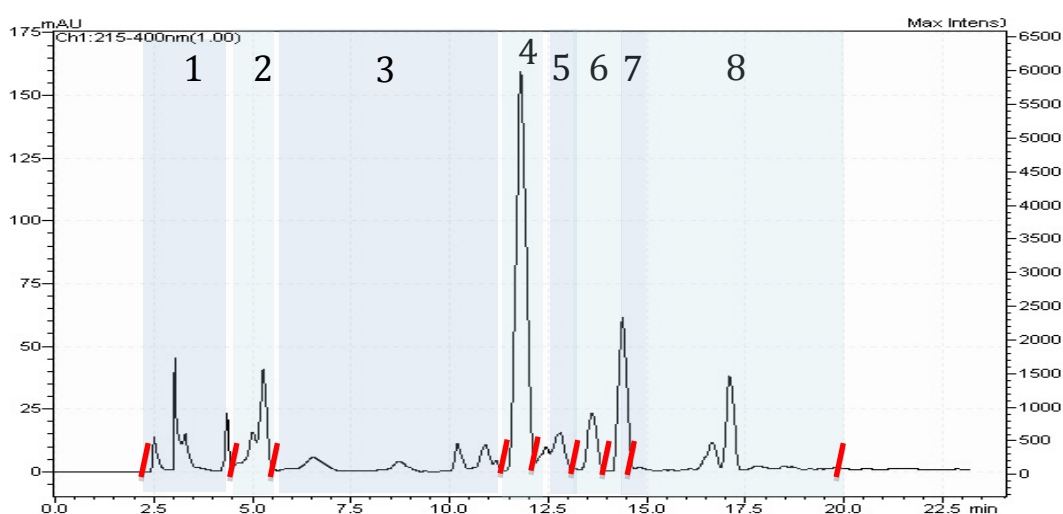


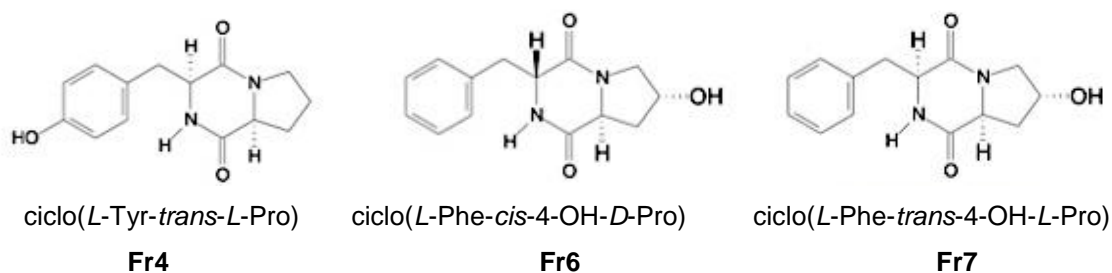
Tabela 9 – Atividade citotóxica do fracionamento da fração E de EAcE-060 contra HL-60 por 48 horas de incubação. CI_{50} obtida através de regressão não linear.

Amostra	CI_{50} μg/mL (IC95%)	Amostra	CI_{50} μg/mL (IC95%)
EAcE-060	0,22 (0,08 – 0,60)	Fr5	0,38 (0,37 – 0,40)
Fr1	40,1 (22,5 – 71,0)	Fr6	1,40 (1,33 – 1,46)
Fr2	> 50 (--)	Fr7	~ 2,95 (--)
Fr3	~ 0,1 (--)	Fr8	~ 1,25 (--)
Fr4	0,35 (0,28 – 0,44)		

4.4.5 Identificação dos compostos das frações Fr4, Fr6 e Fr7

De acordo com o cromatograma do fracionamento de EAcE-060 E, as frações Fr4, Fr6 e Fr7 correspondiam a substâncias purificadas, e a análise por ressonância magnética nuclear de próton (H^1 -RMN) destas amostras, confirmaram que as substâncias pertencem a classe das dicetopiperazinas (figura 27), ciclo(*L*-Tyr-*trans*-*L*-Pro) (Fr4), ciclo(*L*-Phe-*cis*-4-OH-*D*-Pro) (Fr6) e ciclo(*L*-Phe-*trans*-4-OH-*L*-Pro) (Fr7).

Figura 27 – Estrutura química dos compostos presentes nas frações Fr4, Fr6 e Fr7 de EAcE-060 E obtidas dos extrato bruto da BRA-060. Phe (Phenilalanina); Tyr (Tiorina); 4-OH-Pro (4-Hidroxiprolina); Pro (Prolina).



4.4.6. Avaliação da atividade biológica

A atividade das dicetopiperazinas foi avaliada frente a diferentes linhagens. A tabela 10 mostra que não houve seletividade marcante das dicetopiperazinas isoladas pelas diferentes linhagens, com CI_{50} variando de 0,2 μ g/ml para a dicetopiperazina ciclo(*L*-Tyr-*trans*-*L*-Pro) (Fr4) na linhagem de leucemia mielóide crônica K-562 a 7,0 μ g/ml para a dicetopiperazina ciclo(*L*-Phe-*trans*-4-OH-*L*-Pro) (Fr7) em células de glioblastoma SF-295. É importante salientar que as dicetopiperazinas da Fr6 e Fr7 tem perfil de atividade mais semelhante entre si, e essas moléculas são estereoisômeros.

Tabela 10 – CI_{50} e IC 95% ($\mu\text{g/mL}$) das dicetopiperazinas isoladas do extrato da BRA-060, contra as linhagens HL-60, K-562, HCT-116, OVCAR-8 e SF-295. Resultados obtidos através do ensaio antiproliferativo AlamarBlue.

Substâncias	CI_{50} (IC 95%) $\mu\text{g/mL}$				
	Linhagens celulares				
	HL-60	K-562	HCT-116	OVCAR-8	SF-295
Fr4	0,5	0,2	1,2	2,6	0,7
	(0,3 – 0,8)	(0,1 – 0,3)	(1,0 – 1,4)	(2,4 – 2,8)	(0,2 – 2,5)
Fr6	1,3	2,0	3,5	3,4	5,2
	(0,9 – 1,8)	(1,6 – 2,5)	(2,9 – 4,1)	(3,1 – 3,8)	(3,8 – 7,0)
Fr7	0,7	3,3	4,7	3,4	7,0
	(0,4 – 1,1)	(2,3 – 4,8)	(3,9 – 5,6)	(2,8 – 4,1)	(6,1 – 8,0)

As linhagens HL-60 e K-562 foram utilizadas, em seguida, para um estudo de tempo-dependência da atividade exercida pelas dicetopiperazinas isoladas. O experimento foi executado após 24 e 72 horas de incubação, comparando a potencia de cada amostra através dos valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$). Todas as substâncias foram mais ativas após 72 horas de incubação para ambas as linhagens estudadas, ressaltando que com 24 horas de incubação, nenhuma das substâncias exerceu interferência sobre o crescimento celular da linhagem K-562 (tabela 11).

Tabela 11 – CI_{50} e IC 95% ($\mu\text{g/mL}$) das dicetopiperazinas isoladas do extrato da BRA-060 contra as linhagens leucêmicas HL-60 e K-562, incubadas por 24 e 72 horas. Resultados obtidos pelo ensaio antiproliferativo AlamarBlue.

Substâncias	CI_{50} (IC 95%) $\mu\text{g/mL}$			
	HL-60		K-562	
	24 horas	72 horas	24 horas	72 horas
Fr4	1,5	0,5	>10	0,2
	(1,2 – 1,9)	(0,3 – 0,8)		(0,1 – 0,3)
Fr6	5,6	1,3	>10	2,0
	(4,5 – 7,0)	(0,9 – 1,8)		(1,6 – 2,5)
Fr7	11,9	0,7	>10	3,3
	(9,1 – 15,5)	(0,4 – 1,1)		(2,3 – 4,8)

5 DISCUSSÃO

Os esforços dos últimos 30 anos foram bem produtivos para definir os principais rumos no que diz respeito ao metabolismo secundário de diversas classes de organismos marinhos. O resultado foi 7 agentes aprovados como droga para uso na clínica, mais um rico arsenal em testes clínicos caminhando para o mesmo destino. A maioria das indicações é para o tratamento do câncer, mas também com aplicações como antivirais, contra dor crônica, e outros (ver tabela 1). Contudo, a última década tem revelado que a fonte mais produtiva de metabólitos secundários peculiares, na verdade, é derivada de processos metabólicos de microrganismos, incluindo actinomicetos, cianobactérias, microalgas e outros (GERWICK e MOORE, 2012). Os actinomicetos estão presentes em todos os habitats dos oceanos, e são frequentemente detectados em associação com organismos marinhos que produzem metabólitos bioativos (WARD e BORA, 2006).

Os estudos feitos por LIMA em 2004 e por WILKE e colaboradores em 2009 e 2010 revelaram o potencial anticâncer e uma interessante diversidade química para extratos obtidos do invertebrado marinho *P. variabilis* coletado no litoral cearense. Entretanto, a dificuldade na obtenção dos compostos ativos em quantidade suficiente inviabilizou o prosseguimento do trabalho. Estendendo o interesse nestes extratos e unindo as evidências do promissor papel de microrganismos marinhos, principalmente actinomicetos, na busca por substâncias com aplicação biomédica, o presente trabalho propôs investigar o potencial anticâncer de compostos obtidos de bactérias associadas ao zoantídeo *P. variabilis* encontrado na costa litorânea do estado do Ceará.

Ao todo, 10 colônias distintas foram isoladas da microbiota associada ao *P. variabilis*. DUPONT et al., 2013, investigaram a diversidade e atividades biológicas de bactérias associadas a esponja *Phorbas tenacior*, o qual resultou em 23 colônias isoladas, porém, a maioria foi identificada como pertencente ao grupo das Proteobactérias e, apenas 1 classificada como actinomiceto. JIANG et al., 2007, isolaram 54 actinobactérias da esponja *Halicolona sp*, e após análises filogenéticas, ficou determinado que o número exato de colônias distintas foi de 24. ANDRÉO et al., 2012, relataram o isolamento de 84 cepas a partir da ascídia *Eudistoma*

vannamei. Em trabalhos realizados com cnidários, o número varia entre 20 e 42 colônias selecionadas para estudo, após o isolamento de diversos biótipos com padrões morfológicos semelhantes (XIAO et al., 2009; ELAHWANY et al., 2013).

Em certos invertebrados, as bactérias associadas podem ocupar até 40% do volume celular. O acesso mais comum a estas é através do isolamento e cultivo em condições laboratoriais (JENSEN e FENICAL, 1994). Todavia, métodos de análises de DNA provaram que menos de 1% dos microrganismos aquáticos é cultivável pelos métodos convencionais, o que torna imprescindível a aplicação de novas técnicas que aumentem a eficiência de exploração de grupos incomuns e/ou nunca antes reportados (BÉRDY, 2005; SINGH, 2009). Um trabalho publicado por ALEX et al., 2013, obteve 31 colônias de bactérias, por isolamento clássico, de 3 espécies de esponjas, e 349 tipos diferentes evidenciados por clonagem da porção 16S do gene bacteriano presente nos tecidos dos organismos, evidenciando a grande diversidade pouco acessível.

Um outro estudo com a esponja *Theonella swinhoei* enfatizou o melhoramento das técnicas de cultivo para ampliar o número de cepas cultiváveis (LAVY et al., 2013). Essa melhoria envolveu adaptar as condições de cultura necessárias para a maioria dos taxa de bactérias presentes no organismo alvo do estudo. O uso combinado de diversas composições de meio de cultura, variações de estados aeróbicos e microaerofílicos, e a adição de antibióticos, rendeu o aumento da diversidade de bactérias cultiváveis (ao todo, foram 59 unidades taxonômicas operacionais) e conduziu ao isolamento de bactérias inéditas associadas a esponja.

Considerando os fatos acima, a estratégia aplicada neste trabalho para isolar bactérias associadas ao zoantídeo *P. variabilis* é considerada eficiente, porém, não esgota as suas possibilidades. O estudo feito por RABELO em 2012 comparou o perfil de comunidade de bactérias de 3 espécies de zoantídeos (*Palythoa caribaeorum*, *Protopalythoa variabilis* e *Zoanthus sociatus*) e da água do mar, coletados na praia do Paracuru, mesmo local de uma das amostragens deste trabalho. Os resultados de DGGE (do inglês, *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*, usado para detectar bases individuais de DNA) revelaram claramente que as amostras apresentam comunidades bacterianas diferentes, apontando para um alto grau de especificidade entre as bactérias e hospedeiros. Mostrou ainda, que 25% das unidades taxonômicas operacionais foram exclusivas para *P. variabilis*.

Em relação a abundância, a diversidade de filos e classes bacterianas classificadas para cada uma das amostras também foi bastante distinta, sendo que *P. variabilis* e *Z. sociatus* apresentaram os maiores índices, com 6 filos representados em cada, incluindo actinobactéria, enquanto que *P. caribaeorum* e a água do mar somaram 3 e 4 filos, respectivamente (RABELO, 2012). Todas estas evidências apontam para o fato de que há uma diversidade bacteriana bem definida e típica sobrevivendo no habitat conferido pelo zoantídeo *P. variabilis*. Dito isso, recomenda-se aqui um maior esforço no isolamento de seus microrganismos associados.

Dentre as 10 colônias purificadas, 3 foram classificadas como actinomicetos, de acordo com suas características fenotípicas, BRA-035, BRA-036 e BRA-060. O extrato da BRA-035 foi o mais ativo para a linhagem PC-3/M com IC₅₀ na faixa de µg/ml. Apesar de não ter demonstrado grande atividade na triagem inicial (contra PC-3/M), o extrato da cepa BRA 060 foi testado contra outros dois tipos de carcinomas (HCT-116 e HL-60), relevando inibição do crescimento celular de aproximadamente 100% para ambas. Diferentemente de BRA 035, o extrato da cepa BRA 060 demonstrou maior potencia de atividade contra a linhagem HL-60 (CI₅₀ = 0,10µg/ml). Despertou-se assim, o interesse em aprofundar os estudo com essas duas cepas. Para fim de organização, a discussão foi dividida em 2 seções.

As cepas BRA 035 e BRA 060 foram identificadas a partir do sequenciamento e análise comparativa do gene do rDNA 16S como pertencentes ao gênero *Streptomyces*. Este gênero é abundante tanto em ambiente terrestre quanto no ambiente aquático ou marinho, foi proposto por Waksman e Henrici em 1943 (família Streptomecetacea, ordem Actinomycetales), mesmo ano em que foi descoberto o primeiro agente específico efetivo no tratamento da tuberculose, a estreptomicina, derivada do actinomiceto *Streptomyces griseus*. A partir daí, outras substâncias derivadas de espécies do mesmo gênero com atividade antibiótica, importantes até os dias de hoje, foram descobertas, como o cloranfenicol, a vancomicina, tetraciclina, e macrolídeos, definindo a importante capacidade biossintética deste grupo de bactérias, que permanece sem concorrentes no mundo microbiano (JENSEN, MINCER, et al., 2005; ROMANO, PROF e OSAMU, 2009).

Até o momento, mais de 10.000 compostos ativos foram isolados de actinomicetos, sendo que destes, aproximadamente 7.500 são derivados de *Streptomyces* e 2.500 das chamadas espécies raras de actinomicetos. Em revisão

feita por MANIVASAGAN et al. (2013), dos 71 novos metabólitos secundários produzidos por actinomicetos marinhos, 46 foram isolados a partir de estreptomicetos. No trabalho já citado acima, ANDRÉO e colaboradores, 2012, aplicaram esforços no isolamento de bactérias associadas ao tunicado *Eudistoma vannamei*, afim de provar que o composto citotóxico contra linhagens de câncer humano relatado para o invertebrado, um derivado da estaurosporina, era produzido por uma delas. Os resultados foram animadores, uma cepa do gênero *Streptomyces* foi reconhecida como produtora de estaurosporina, mas não do derivado oxigenado isolado da ascídia. Provavelmente, o composto encontrado no extrato da ascídia resulta de uma metabolização em parceria do invertebrado com a bactéria produtora.

Evidentemente, os estreptomicetos são os mais notáveis produtores no que diz respeito ao número, versatilidade e diversidade de estruturas de metabólitos produzidos por bactérias da ordem Actinomycetales (BÉRDY, 2005).

5.1 Estudos com BRA-035

O extrato da espécie *Streptomyces sp.* (BRA 035), encontrada neste trabalho, apresentou alta potência em ensaios de viabilidade celular, contra a linhagem de câncer de próstata metastático (PC-3/M). O fracionamento bioguiado de seu extrato bruto levou a purificação e isolamento dos compostos piericidina A, glicopiericidina A e piericidina D. Por se tratar de um composto puro com rendimento relativamente alto e facilidade na obtenção, optou-se por seguir os estudos neste trabalho com Piericidina A. Esta substância teve o seu primeiro isolamento reportado para 1965, por TAKAHASHI et al. (TAKAHASHI e TAMURA, 1966), porém, o trabalho de revisão da sua estrutura estereoquímica, feito por YOSHIDA, SHIRAISHI e TAKAHASHI, 1977, afirma que a mesma foi descoberta por TAMURA et al. em 1963. Ambos os trabalhos concordam que, em relação a sua atividade biológica, inicialmente, a Piericidina A foi designada como um potente inseticida, e isolada da espécie *Streptomyces mobaraensis*.

Ao passar dos anos, muitos casos de isolamento de diversas formas de piericidinas, produzidas por outras espécies de *Streptomyces*, foram relatados (YOSHIDA, SHIRAISHI e TAKAHASHI, 1977). Elas exibem promissora atividade biológica para uma grande variedade de inseticidas, agentes antibióticos ou

antifúngicos, e também como inibidores da resposta imune de proteínas (SURUP et al., 2008). Sua atividade citotóxica também foi estudada. A tabela 12 a seguir relaciona os trabalhos publicados nesta área, com valores de CI_{50} encontrados para a diversidade de piericidinas contra diferentes linhagens celulares. Nenhum relato da atividade citotóxica de piericidina A foi encontrado para as linhagens testadas neste trabalho, assim como a ordem de grandeza de sua potência contra algumas dessas linhagens (picomoles/microlitro, ver tabela 7).

Tabela 12 – Atividade citotóxica reportada para os diferentes tipos de piericidina de acordo com a literatura. CI_{50} (nM); ND = não divulgado pelo autor.

Referência bibliográfica	Tipo de piericidina	Linhagem celular testada*	CI_{50} nM
YOSHIDA et al., 1979	Piericidina A	Culex cell	6.76×10^3
		L-cell	8.74×10^3
SCHNERMANN et al., 2006	Piericidina A1	L1210	5.00
	Piericidina B1	L1210	6.00
HAYAKAWA et al., 2007	Piericidina C7	RG-E1A-7	1.50
		Neuro-2a	0.83
	Piericidina C8	RG-E1A-7	0.48
		Neuro-2a	0.21
HWANG et al., 2008	Piericidina A	HT-29 (ER) +g	6.40
		HT-29 (ER) -g	7.70
SURUP et al., 2008	Piericidina A	SMP	5.00
		L929	0.43
KITAGAWA et al., 2010	Glicopiericidina A	A431	17.0
	Piericidina A	A431	0.68
MOMOSE et al., 2010	Piericidina A	PANC-1	ND
SINGH et al., 2013	Piericidina A	MIAPaCa-2	8^{-1}

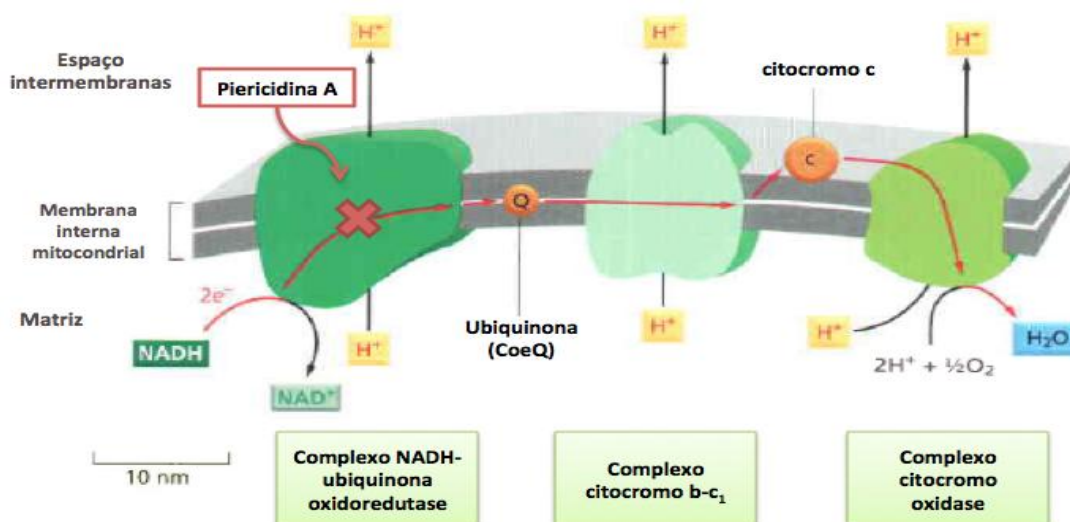
* Culex cell (células do tecido ovariano do inseto *Culex pipiens*); L-cell (células do tecido subcutâneo de rato); L1210 (leucemia de ratos); RG-E1A-7 (células da glia de ratos transfectadas com gene de adenovírus E1A); Neuro-2a (neuroblastoma de camundongos); HT-29 (ET) +g (células de câncer de cólon resistente ao quimioterápico etoposídeo cultivadas em meio contendo 2-deoxyglucose); HT-29 (ET) -g (cultivadas em meio glucose deficiente); SMP (partículas submitocondriais do coração bovino);

L929 (fibroblastos de camundongos; A431 (carcinoma epidermal humano); PANC-1 (carcinoma pancreático); MIAPaCa-2 (carcinoma pancreático).

As piericidinas apresentam um núcleo 4-hidroxipiridina (cabeça cíclica), seguida de uma cadeia lateral ramificada e insaturada (cauda hidrofóbica) (ver figura 16). Tal aparência estrutural está relacionada com a da Coenzima Q (CoeQ; ubiquinona), enzima responsável pela transdução energética na cadeia respiratória mitocondrial. De fato, seu mecanismo de ação está relacionado com a interferência no transporte de elétrons através da membrana interna da mitocôndria de células animais, especificamente bloqueando a atividade do complexo I (TAKAHASHI e TAMURA, 1966; YOSHIDA, SHIRAISHI e TAKAHASHI, 1977).

As mitocôndrias estão presentes em praticamente todas as células eucarióticas. São organelas de membranas delimitadas, que convertem energia em formas que podem ser usadas para guiar as reações celulares (ATP) (figura 28 adiante). Possuem grande quantidade de membrana interna, a qual tem um papel crucial na sua função de converter energia, promovendo estrutura para o processo de transporte de elétrons. O complexo I (NADH-ubiquinona oxidoreductase) é uma enzima transportadora presente em abundância na membrana interna da mitocôndria. São responsáveis por receber os pares de elétrons carregados pelo NADH⁻ (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo reduzido), seguido da transferência para a ubiquinona (Coenzima Q), que catalisa o primeiro estágio da fosforilação oxidativa. A reação de oxirredução é finalizada por um transporte ativo de prótons ao longo da membrana interna mitocondrial, resultando em produção de ATP. O complexo I também está envolvido na formação do gradiente eletroquímico transmembrânico, com a estequiometria de $4\text{H}^+/2\text{e}^-$ ($\text{NADH} + \text{H}^+ + \text{CoeQ} + 4\text{H}^+ \leftrightarrow \text{NAD}^+ + \text{CoeQH}_2 + 4\text{H}^+$). É o maior complexo de transdução de energia, seu domínio periférico possui o sítio de ligação catalítico de NADH⁻, enquanto que o domínio da membrana é constituído por 7 sub-unidades (ALBERTS et al. 1998; DARROUZET et al., 1998; OHNISHI et al., 2008).

Figura 28 – Esquema demonstrativo do transporte de elétrons através da membrana interna mitocondrial evidenciando o sítio de ação do composto piericidina A. (Adaptado de ALBERTS et al. 1998).



A inibição da atividade de NADH-oxidase exercido pela piericidina A envolve principalmente o efeito bloqueador do transporte de elétrons mitocondrial através do complexo I, resultando em diminuição da produção de energia pela cadeia respiratória, e, além disso, também exerce efeito no aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*) (FATO et al., 2010; OHNISHI et al., 2010; TAKAHASHI e TAMURA, 1966). DARROUZET et al., 1998, propuseram um modelo de localidade para o sítio de ligação das piericidinas, como sendo na interface entre os dois domínios do complexo I, mesmo sítio de ligação da ubiquinona (Coenzina Q). A produção de ROS pelo complexo I é estritamente relacionado com o seu estado inibitório. Ao que parece, piericidina A induz uma mudança conformacional na enzima transportadora, tornando o local de escape de elétrons mais acessível para o oxigênio molecular (O_2), que sofre redução, resultando em ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (FATO et al., 2010). Esta espécie reativa de oxigênio tem potencial para causar destruição de proteínas, oxidação de cadeias laterais de aminoácidos, e a formação de outras espécies oxidativas, podendo levar a danos em todos os tipos de estruturas celulares (estresse oxidativo) (ALBERTS et al., 1998).

O duplo efeito relatado para o mecanismo de ação de piericidina A pode explicar o padrão de atividade em distribuição bimodal observado para as curvas de concentração-efeito nas linhagens mais sensíveis deste trabalho (figura 16). Em

estatística, este tipo de distribuição diz respeito a uma curva de frequência, em que há dois intervalos, que abrangem um número relativamente amplo de casos, separados por um ou mais intervalos com menos casos (CALLEGARI-JACQUES, 2007). É uma mistura de duas populações estatísticas, que, no propósito dos resultados encontrados aqui, podemos considerar como sendo uma mistura de dois efeitos inibitórios distintos, somatórios ou efeito-dependentes.

FATO et al., 2010, evidenciaram que, em baixas concentrações, a piericidina A bloqueia a transferência de elétrons na mitocôndria sem induzir a formação de ROS, enquanto que, em altas concentrações, além de bloquear a transferência de elétrons, a substância induz a produção das espécies de oxigênio reativos. O estresse oxidativo, conseqüentemente, seria responsável pelo incremento na toxicidade da piericidina. Sendo assim, possivelmente, a distribuição bimodal dos dados nas curvas de concentração-efeito para as linhagens OVCAR-8, PC-3/M, PC-3 e HCT-116, podem ser explicadas pelo duplo efeito relacionado ao mecanismo de ação de piericidina A.

Nas maiores concentrações testadas, variando entre as linhagens utilizadas, a alta incidência de inibição do crescimento celular pode estar relacionado com a produção de ROS mais a deficiência energética, enquanto que, a partir de uma dada concentração mais baixa, que também varia de acordo com a linhagem, a proliferação celular diminui mas não cessa, possivelmente devido à diminuição do metabolismo causado pela bloqueio da cadeia respiratória mitocondrial. Todavia fazem-se necessários estudos adicionais para medir a produção de ROS e inibição da cadeia transportadora de elétrons nas diferentes concentrações de piericidina A para cada linhagem celular.

As células tumorais desenvolveram aparatos fisiológicos diferenciados afim de garantir sua rápida proliferação e invasão a outros tecidos, a reprogramação do metabolismo energético é uma delas (HANAHAN e WEINBERG, 2011). Muitos tipos de câncer mostram aumento da captação de glicose e elevada taxa glicolítica, sugerindo que alterações metabólicas promovam vantagem ao crescimento de células tumorais (GATENBY e GILLIES, 2004). As células cancerígenas alteram o metabolismo celular e promovem suporte para 3 necessidades básicas da proliferação desenfreada: rápida geração de ATP para manutenção do estado energético, aumento da biossíntese de macromoléculas, e manutenção do estado redox* apropriado (CAIRNS, HARRIS e MAK, 2011)

O fenótipo metabólico melhor caracterizado para este processo envolve a substituição do ATP produzido pela fosforilação oxidativa da cadeia respiratória mitocondrial, por ATP advindo da via glicolítica, mesmo em condições normais de oxigênio, o chamado efeito Warburg. Apesar da produção de ATP pela glicólise ser mais rápida do que a fosforilação oxidativa, ela é menos eficiente em termos de ATP produzido por unidade de glucose consumida. Esta mudança metabólica exige, portanto, que a célula tumoral implemente uma taxa anormal elevada de captação de glucose para atender as suas necessidades de aumento energético, biossíntese e equilíbrio do estado redox (ALBERTS et al., 1998; CAIRNS, HARRIS e MAK, 2011).

Estes efeitos são regulados por uma grande variedade de mutações genéticas, que resultam em vias de sinalização guiadas pela perda de genes supressores de tumor (p.ex, p53), e ativação de oncogenes (p. ex, PI(3)K; HIF; MYC; PKM2). Contudo, tumores com as mesmas lesões genéticas possuem diferentes perfis de metabolização, dependendo do tecido em que surgem, indicando que o microambiente tecidual afeta fortemente a atividade metabólica de células tumorais (SCHULZE e HARRIS, 2012). Isto pode explicar a diferença na atividade e seletividade de piericidina A para as linhagens celulares tumorais testadas neste estudo, sugerindo um perfil de metabolização diferenciado entre elas.

SF-295 e HL-60 foram consideradas as linhagens mais resistentes para piericidina A. Apesar de ocorrer inibição do crescimento celular nas maiores concentrações testadas em SF-295, rapidamente o efeito diminui e é anulado nas concentrações seguintes, enquanto que, em HL-60, nenhum perfil de atividade citotóxica foi observado. A revisão feita por TCGA (do inglês, *The Cancer Genome Atlas*), 2008, identificou a ativação da via phosphatidylinosid-3-OH cinase, regulada pelo gene PI(3)K, como sendo uma característica do perfil genético de glioblastomas. A função desta via é aumentar a captação de glucose, melhorar a atividade e localização da hexocinase* mitocondrial, e melhorar o fluxo glicolítico (SCHULZE e HARRIS, 2012). SF-295 é uma linhagem celular advinda de glioblastoma humano, portanto, pode-se especular que, a ativação da via de sinalização promovida pelo favorecimento do oncogene PI(3)K poderia explicar a resistência desta linhagem contra piericidina A.

Para a linhagem leucêmica promielocítica (HL-60), foi descrito pela literatura a deficiência no gene p53 (supressor de tumor), e amplificação do gene MYC (oncogene) (MARDIS et al., 2009; MISAWA, STAAL e TESTA, 1987; WOLF e

ROTTER, 1985). A via de sinalização de MYC aumenta a glutaminólise através de transcrição, por um programa sincronizado com a dependência de glutamina pelas células que possuem esse gene (SCHULZE e HARRIS, 2012). Também é responsável por aumentar a biogênese e funções mitocondriais (CAIRNS, HARRIS e MAK, 2011).

O gene supressor de tumor p53 tem como funções mais conhecidas a resposta ao dano de DNA e regulação da apoptose, entretanto, também é importante como regulador do metabolismo celular (MARDIS et al., 2009). Sua função envolve a inibição da via glicolítica através da superexpressão do gene TP53-glicose induzida, e da enzima reguladora da apoptose (TIGAR), tal qual diminui os níveis de *frutose-2,6-bifosfato*, o ativador glicolítico. Também inibe a via de sinalização de PI(3)K, resultando em supressão da glicólise, e promove fosforilação oxidativa pela ativação da expressão de SCO₂, gene necessário para a montagem do complexo oxidativo citocromo c, na cadeia transportadora de elétrons (CAIRNS, HARRIS e MAK, 2011; SCHULZE e HARRIS, 2012). Sendo assim, a deficiência ou deleção do gene p53 em células tumorais, recapitula seu metabolismo para as consequências metabólicas do efeito Warburg, que, em conjunto com a atividade guiada por MYC, supostamente explica a resistência de HL-60 ao tratamento com piericidina A.

A baixa potencia de piericidina A contra a linhagem de câncer de próstata metastático PC-3, pode ser referenciada a presença do gene PFKFB4 (6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biophosphatase 4), uma isoforma de phosphofructocinase PFK2. Este gene é requerido para o balancear da atividade glicolítica e a produção de NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatase), que neste contexto age como um importante agente antioxidante, garantindo a estabilização do estado redox em células de câncer de próstata, como as da linhagem PC-3 (ROS et al., 2012). O NADPH produzido como consequência da alteração metabólica de células cancerígenas age como um cofator, promovendo a redução da potencia de muitas reações enzimáticas. Tal ação é crucial para a biossíntese de macromoléculas. Também age como antioxidante e forma parte da defesa contra as ROS, que são produzidas durante a rápida proliferação celular (CAIRNS, HARRIS e MAK, 2011).

Contraopondo a diminuta potência em PC-3, a sua linhagem derivada (PC-3/M) demonstrou um perfil de alta sensibilidade para piericidina A. PC-3 foi estabelecida

em 1979 por KAIGNH et al., e foi isolada da medula óssea de um paciente do sexo masculino, 62 anos de idade, com adenocarcinoma de próstata metastático (nível IV). PC-3/M foi isolada a partir de um tumor induzido por PC-3 em camundongos machos, trabalho realizado por OHNUKI et al., 1980, com o objetivo de identificar mudanças nas organizações cromossômicas entre a linhagem parental e a induzida. As duas linhagens apresentaram aneuploidia em todas as passagens.

Após a transfecção para o camundongo, a sublinhagem tumoral derivada PC-3/M demonstrou distribuição do número de cromossomos radicalmente limitada. Enquanto que as células PC-3 usadas para induzir o tumor tinham modas em 61 e 65, com uma ampla gama de distribuição, PC-3/M apresentou uma única moda de ~60 cromossomos. Esta observação sugeriu que a seletiva redução na distribuição do número de cromossomos em PC-3/M ocorreu ao longo do desenvolvimento do tumor dentro do camundongo (OHNUKI et al., 1980). Os esforços na busca por mais material na literatura, evidenciando as diferenças genéticas entre as duas linhagens relacionadas, não rendeu maiores informações. Talvez, a diferença na sensibilidade das linhagens à piericidina A, esteja relacionada com o silenciamento de determinado(s) gene(s), durante a diminuição dos números de cromossomos de PC-3 para PC-3/M, relatada no trabalho acima.

As linhagens HCT-116 (câncer colón retal) e OVCAR-8 (câncer de ovário), apresentaram inibição do crescimento celular com o tratamento de piericidina A, sendo a última (OVCAR-8), a mais sensível dentre todas as linhagens testadas neste estudo (CI_{50} 0,5 pM, ver tabela 7). Análises genômicas revelaram que uma grande parte dos cânceres de ovário são caracterizados por possuírem mutação no gene TP53 (TCGA, 2011). A mesma mutação foi reportada para carcinomas colón retais (TCGA, 2012). Este gene foi mencionado acima como sendo inibidor da via glicolítica, e sua inibição resulta na reprogramação metabólica pela célula tumoral. A utilização da glicose como fonte de energia para a manutenção vital e proliferativa de células tumorais, possivelmente funciona como sendo uma válvula de escape para os efeitos que piericidina A exerce sobre as mesmas (bloqueio da cadeia transportadora de elétrons, resultando em deficiência energética mais aumento da produção de ROS), porém, este mecanismo adaptativo parece não surtir efeito nas linhagens HCT-116, PC-3/M e OVCAR-8 tratadas com piericidina A.

5.2 Estudos com BRA 060

A segunda cepa selecionada para estudo apresentou extrato ativo preferencialmente para linhagens leucêmicas com IC_{50} variando de maior que 50 $\mu\text{g/ml}$ para a linhagem de carcinoma de próstata metastático PC-3/M a 0,10 $\mu\text{g/ml}$ para a linhagem leucêmica HL-60. É importante ressaltar que essa diferença na seletividade entre o extrato da BRA-035 e do seu composto bioativo piericidina A com o extrato da BRA-060 também estimulou o estudo da cepa BRA-060, pois sugeria a presença de substâncias com diferentes perfis de atividade.

O fracionamento bioguiado resultou no isolamento de 3 substâncias pertencentes ao grupo das dicetopiperazinas (dipeptídeos cíclicos – Fr4, Fr6 e Fr7), identificadas através de análise de H^1 -RMN e de espectroscopia de massa de alta resolução (anexos C, D e E). As 3 dicetopiperazinas isoladas possuem a mesma massa molecular (260.11) e fórmula química ($C_{14}H_{16}N_2O_3$), diferenciando entre si pela posição do grupo hidroxila em Fr4, e estereoquímica da estrutura entre Fr6 e Fr7.

As dicetopiperazinas (DCP) representam um padrão estrutural comum de ocorrência natural, os primeiros relatos datam de 90 anos atrás, em trabalho publicado por ABDERHALDEN e KOMM, 1924. São os menores peptídeos cíclicos conhecidos, consideradas metabólitos secundários funcionais, frequentemente geradas por consequência da produção ou degradação de oligopeptídeos, ou biosintetizadas por aminoácidos através de uma grande variedade de organismos (DINSMORE e BESHORE, 2002; SAMMES, 1975). A habilidade de produzir DCPs por microrganismos é generalizada. FENICAL, 1993, afirmou que 90% das bactérias Gram (-) são capazes de produzir DCPs, que também foram isoladas de bactérias Gram (+) e fungos, além de organismos marinhos (HUANG et al., 2010).

Assim como a variedade de sua ocorrência, muitas são as designações de atividade biológica para DCP's, que englobam atividade antimicrobiana, antitumoral, antiviral, antifúngica, antihiperglicêmica, afinidade por canais de cálcio e diversos receptores adrenérgicos, além de promotor do crescimento de plantas (revisado por HUANG et al., 2010; MARTINS e CARVALHO, 2007). A tabela 13 abaixo descreve algumas formas de dicetopiperazinas isoladas de microrganismos marinhos, e que, de alguma forma, tem relação com os resultados encontrados neste trabalho.

Tabela 13 – Algumas dicetopiperazinas (DCP's) isoladas de microrganismos marinhos e suas respectivas atividades biológicas (adaptado de HUANG et al., 2010).

DCP's	Origem	Atividade biológica*	Referência bibliográfica
11'-dideoxiverticilina A	Fungo isolado de alga verde	Citotóxico contra HCT-116	SON, et al, 1999
Leptosinas (O-S)	Fundo isolado de alga	Citotóxico P388 e 39 linhagens de células tumorais	YAMADA, et al, 2004
Gliocladrida	Fungo isolado do sedimento	Citotóxico contra A375-5	YAO, et al, 2007
14-hidroxiterezina D	Fungo isolado de madeira a deriva no mar	Fraca atividade citotóxica em HL-60	ZHANG, et al, 2008
L-7,9-dihidroxi-8-metoxi-Phe	Fungo isolado de alga	Fraca atividade citotóxica em HL-60	LIN, et al, 2008
Nocazina A e B	Actinomiceto isolado de sedimento	Sem atividade em HL-60 e A549	FU et al., 2011
Ciclo (2-OH-Pro-R-Leu)-ciclo(4-OH-S-Pro-S-Trp)	Streptomiceto isolado do sedimento	Citotoxicidade em HL-60 > 50µM	LI et al., 2011
Ciclo(4-5-OH-R-Pro-R-isoleucina)	Bactéria isolada de esponja	Fraca citotoxicidade em MCF-7, H460 e HT-29	OVENDEN et al., 2011
12,13-dihidroxfumitremorgina C	Fungo isolado do sedimento	Citotóxico U-937 e PC-3	WANG et al., 2012
bmDKP imDKP	Streptomiceto associado com alga	Atividade anti-fouling	CHO et al., 2012
(3Z,6Z)-3- (4-hidroxi-benzilidena)-6-isobutilidenopiperazina-2,5-diona	Streptomiceto isolado de sedimento	Atividade antiviral (H1N1 – Influenza)	(WANG et al., 2013)

* Linhagens celulares: P388 (leucemia LLA-T murinho); A375-5 (melanoma parental); MCF-7 (tumor de mama); H460 (câncer de pulmão); U-937 (linhagem monocítica).

Em se tratando de dicetopiperazinas do ambiente marinho, vale relembrar aqui a substância plinabulina, descrita e citada na sessão introdutória deste trabalho. A plinabulina é uma dicetopiperazina análoga sintética inspirada na halimida (NPI-2350), um produto natural obtido do fungo marinho *Aspergillus sp.*, isolado da associação com a alga *Halimeda copiosa* (RATEB e EBEL, 2011). Vem sendo desenvolvida pela *Nereus Pharmaceutical Inc*, e atualmente encontra-se em fase II de teste clínico para pacientes com câncer de pulmão avançado, e em fase I para tumores sólidos e linfomas (IMHOFF, LABES e WIESE, 2011). Esta substância liga-se com a β -tubulina solúvel no citosol impedindo a sua polimerização. Os estudos *in vivo* determinaram uma notória seletividade para células endoteliais imaturas em proliferação, aquelas responsáveis pela neovascularização essencial para o suprimento de sangue dos tumores sólidos. Bloqueando este suprimento, as células tumorais são levadas a morte por necrose devido a falta de nutrição (Revisado por COSTA-LOTUFO et al, 2009). Revela-se assim, o potencial terapêutico antitumoral de dicetopiperazinas advindas do ambiente marinho.

As DCP's apresentam um sistema heterocíclico peculiar, encontrado em muitos produtos naturais, e constituem uma rica fonte de novos compostos biologicamente ativos (LI e YANG, 2002). Algumas das propriedades químicas de dicetopiperazinas demonstram ser de grande interesse para a química medicinal, como a resistência a proteólises, mimetismo de grupos farmacofóricos, substituição de grupo estereoquímico, conformação rígida e, doador e receptor de ligações de hidrogênio (MARTINS e CARVALHO, 2007). Estes compostos apresentam um esqueleto (*scaffold*) comum, facilmente obtido por procedimentos convencionais, que favorecem a diversidade estrutural. Características farmacodinâmicas e farmacocinéticas favoráveis são adquiridas através de compostos que possuem estas propriedades, resultando em agentes promissores para o desenvolvimento de novas drogas (WANG, et al, 2002; Fischer, 2003). As dicetopiperazinas possuem estruturas privilegiadas para a descoberta de novos compostos líderes através da química combinatória, e são consideradas ideal para o desenvolvimento racional de novos agentes terapêuticos (MCCLELAND, et al, 2004; NIIDOME, et al, 2003).

O primeiro relato para a dicetopiperazina (Fr4) ciclo(L-Tyr-*trans*-L-Pro) encontrado na literatura foi o seu isolamento a partir do fungo patogênico de plantas *Alternaria alternata*, em 1988. Este fungo produziu muitos tipos de DCP's,

entretanto, ciclo(L-Try-*trans*-L-Pro) foi a única que apresentou ação fitotóxica, causando lesões necróticas escuras nas folhas de ervas daninhas (PARK e STROBEL, 1994; STIERLE, CARDELLINA e STROBEL, 1988). Outra ocorrência interessante foi relatada a partir de microrganismos parasitas de vermes nematoides terrestres (GUO et al., 2007; SEO et al., 2012). Suas atividades biológicas envolvem fitotoxicidade em mudas de pinheiro japonês e inibição da enzima fosfolipase A2.

TEASDALE et al., 2011, isolou a mesma substância da bactéria marinha *Halobacillus salinus*, que demonstrou efeitos inibitórios no “*quorum sensing*” bacteriano. “*Quorum sensing*” é um termo genérico que descreve o mecanismo de comunicação bacteriana (célula para célula), que atua como um sinalizador químico que coordena a expressão gênica quando a população alcança alta densidade celular. Muitas bactérias patogênicas regulam a produção de biofilme, fatores de virulência e outros comportamentos biológicos através deste processo de sinalização química. Este mecanismo depende de moléculas que possuam tamanho diminuto, para que possam se difundir com facilidade entre as células bacterianas (TOMMONARO et al., 2012). Substâncias com ações inibitórias do “*quorum sensing*” funcionam como um novo mecanismo antimicrobiano, atuando inclusive, em bactérias resistentes a múltiplas drogas (TEASDALE et al., 2011).

Assim, surgiu o grande interesse em sua atividade biológica, entretanto, por se tratar de uma molécula extremamente polar, limitações quanto a sua permeabilidade poderia resultar em um potencial terapêutico limitado. Afim de melhorar a atividade antimicrobiana exercida por ciclo (L-Try-*trans*-L-Pro), um grupo de estudos da África do Sul encapsulou a substância em lipossomos. O resultado foi expressivamente mais eficiente quanto a inibição da proliferação bacteriana. Especula-se que o encapsulamento melhora a entrada do composto na célula bacteriana, ou a protege da degradação enzimática exercida por agentes antimicrobianos (KILIAN et al., 2011). Evidencia-se assim, o potencial biotecnológico de Fr4, que, além de apresentar atividade biológica, ainda demonstra ser flexível no que diz respeito a sua manipulação.

Outras duas DCP's foram isoladas das frações Fr6 e Fr7 de EAcE060 E, sendo a estereoquímica de suas estruturas responsável por diferenciá-las. Fr6 foi identificada como ciclo (L-Phe-*cis*-4-OH-D-Pro). Pouco foi encontrado sobre a ocorrência desta molécula na literatura. Seu primeiro relato data de 1998, isolada da levedura marinha *Aereobasidium pullulans* (SHIGEMORI et al., 1998). Dez anos

depois, HUAYUE et al., 2008, evidenciaram sua ocorrência nos metabólitos oriundos de *Psychrobacter sp.*, uma bactéria marinha isolada da associação com uma esponja. Mais recentemente, GAO et al., 2014, isolaram ciclo (L-Phe-*cis*-4-OH-D-Pro) do coral tipo gorgônia *Menella kanisa*. Todos os trabalhos apenas relataram a existência desta substância nos extratos produzidos pelos devidos organismos. HUAYUE, et al, 2008, testou o composto para avaliar seu efeito protetor contra a infecção causada pela bactéria *Vibrio vulnificus*, que induz citotoxicidade em células do epitélio intestinal humano, todavia, nenhuma atividade foi registrada. Vale ressaltar que, em todos os casos, a origem de ciclo (L-Phe-*cis*-4-OH-D-Pro) adveio do ambiente marinho, alimentando desta forma, as evidências de moléculas com estruturas únicas presentes neste ambiente.

De acordo com os dados de H¹ RMN, a substância Fr7 foi identificada como ciclo (L-Phe-*trans*-4-OH-L-Pro). RUDI et al., 1994, identificou esta substância no extrato feito a partir da esponja marinha *Jaspis digonoxea*. O mesmo extrato também evidenciou a presença de ciclo (L-Tyr-*trans*-L-Pro) – Fr4, discutida acima. Outros relatos para Fr7 foram reportados em extratos do fungo *Aspergillus fumigatus*, resgatado do solo do pantanal (FURTADO et al., 2005), e da bactéria associada a outra esponja marinha *Stelletta sp* (HUAYUE et al., 2008). Dois trabalhos descreveram o envolvimento desta substância com a sinalização do “*Quorum sensing*” bacteriano (JIANG et al., 2000; ROSA, MITO e TOMMONARO, 2003), nos dois casos, ciclo (L-Phe-*trans*-4-OH-L-Pro) foi isolado de bactérias marinhas. JIANG, et al, 2000, afirmou que o composto não apresentou atividade antimicrobiana, entretanto, estimulou a produção de extratos com potencial antibiótico pela cepa *Pseudoalteromonas luteoviolacea*, sugerindo que esta molécula possa representar uma nova classe de sinalizador bacteriano que medeia o “*quorum sensing*”.

A diversidade dos produtos naturais com aplicação farmacológica arranja-se dentro da categoria dos metabólitos secundários, as moléculas que são produzidas por vias condicionadas e ativadas em contextos ou situações particulares (CLARDY e WALSH, 2004). CRONAN JR et al., 1998, encontrou Fr7 em extrato produzido por uma bactéria associada ao zoantídeo *Palythoa sp*. Sua atividade foi testada quanto a capacidade de promover o crescimento de plantas, com resultados positivos. Além disso, os autores relataram que, substâncias que contém derivados de hidroxiprolina (OH-Pro), são conhecidas por induzir resistência a ambientes com pouco

fornecimento de água ou secos, e estimulam o crescimento em mudas de arroz. Sendo assim, estima-se que a função exercida pela bactéria quando em associação ao zoantídeo, seja de promover um papel importante no crescimento da colônia, e de resistência a seca, uma vez que este habita partes rasas do ambiente marinhos, e pode ficar exposto ao ar livre em períodos de baixa-mar.

Apesar de todas as DCP's isoladas de BRA 060 terem tido ocorrência relatada pela bibliografia, nenhum trabalho foi feito quanto a sua atividade citotóxica. Este pode ser o primeiro relato de suas atividades antitumorais, e estudos relacionados aos efeitos citotóxicos e mecanismo de ação, assim como outros experimentos de confirmação da elucidação estrutural das moléculas, estão em andamento. Os primeiros resultados mostrados aqui, indicam que as substâncias não possuem uma seletividade expressiva entre as diferentes linhagens testadas, apesar de HL-60 e K-562 terem demonstrado uma tímida sensibilidade aos seus efeitos. As duas linhagens possuem origem hematopoiéticas, podendo ser a primeira pista no direcionamento para a elucidação do seu mecanismo de ação. Contudo, para este trabalho, apenas 3 das 6 frações ativas de EAcE060 E tiveram a estrutura de seus compostos ativos elucidados, evidenciando que o arsenal químico produzido pela cepa BRA 060 ainda não foi totalmente desvendado.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Cada vez mais estudos evidenciam o arsenal peculiar de substâncias com atividade biológica oriundas de microrganismos marinhos. A união das áreas de ecologia, biologia, química e farmacologia, é de extrema importância para o sucesso do rastreamento e identificação de metabólitos com aplicação terapêutica. O zoantídeo *P. variabilis* encontrado no litoral cearense, possui uma microbiota associada interessante para a produção de compostos ativos. A investigação deste potencial com a cepa *Streptomyces* sp. (BRA 035), levou ao isolamento da piericidina A, um composto já conhecido e estabelecido pela literatura da área, enquanto que a cepa BRA 060, demonstrou produzir 3 dicetopiperazinas semelhantes, também com ocorrência encontrada pela literatura, entretanto sem relatos de suas atividades citotóxicas. Além do mais, ainda resta outra possibilidade de actinomiceto produtor de substâncias citotóxicas isolado até o momento – BRA 036. Sendo assim, novos esforços para a continuidade da exploração da microbiota associada de *P. variabilis* devem ser realizados.

Algumas limitações encontradas neste trabalho, diz respeito ao cultivo dos microrganismos, e instabilidade química dos compostos isolados. A primeira fermentação em grande quantidade da cepa BRA 060 em meio líquido A1 resultou em extrato bruto sem atividade, o que inviabilizou o prosseguimento dos estudos, até que se testasse novas alternativas para solucionar o contratempo. A proposta para este caso foi testar extratos produzidos por BRA 060 crescida em outro meio de cultura. Os resultados foram positivos e, após outra fermentação em larga escala, desta vez com o meio Marine Broth, BRA 060 produziu um extrato bruto ativo, do qual foram isoladas 3 substâncias citotóxicas. O caso da instabilidade química dos compostos varia em função de características próprias de cada molécula. Todos os estoques de piericidina A perderam atividade após alguns meses estocados em freezer à -20°C. Uma nova fermentação da cepa BRA 035 foi realizada afim de adquirir novos estoques ativos. Apesar das limitações citadas, o trabalho prosseguiu com sucesso, alcançando todos os objetivos propostos.

7 CONCLUSÕES

Duas bactérias isoladas do zoantídeo *P. variabilis* foram estudadas. *Streptomyces* sp. (BRA 035) é produtora do composto bioativo piericidina A, enquanto que BRA 060 produziu as dicetopiperazinas ciclo(L-Try-*trans*-L-Pro) (Fr4); ciclo(L-Phe-*cis*-4-OH-D-Pro) (Fr6); e ciclo(L-Phe-*trans*-4-OH-D-Pro) (Fr7), ressaltando o potencial biotecnológico da microbiota associada a esse invertebrado.

O mecanismo de ação da piericidina A envolve a perturbação do metabolismo energético celular exercido pela mitocôndria, que leva ao déficit de energia metabólica e, em doses mais altas, produção de ROS. As consequências são a inviabilidade da proliferação celular e força vital da célula, podendo resultar em apoptose.

Apesar das dicetopiperazinas isoladas de BRA 060 terem tido sua ocorrência já descrita, nenhum trabalho foi feito para avaliar a atividade citotóxica, podendo este ser o primeiro relato sobre suas propriedades antitumorais. Todas demonstraram potente atividade citotóxica contra as linhagens SF-295, OVCAR-8, HCT-116, K-562 e HL-60, sendo ligeiramente mais potente para as duas últimas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AbD SEROTEC – Disponível em: <http://www.abdserotec.com/alarblue-assay-cell-proliferation-cytotoxicity.html>. Acessado em: fevereiro de 2014.

ABDERHALDEN, E. e KOMM, E. The formation of diketopiperazines from polypeptides under various conditions. **Z. Physiol. Chem.** 139: 147-152. 1924.

ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell**. Cap. 14: Energy conversion: Mitochondria and Chloroplasts. 5rd Ed. Garland Publishing. 1998.

ALEX, A. et al. Evidence of Unique and Generalist Microbes in Distantly Related Sympatric Intertidal Marine Sponges (Porifera: Demospongiae). **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. e80653, doi:10.1371/journal.pone.0080653, 2013.

ANDRÉO, M. A. et al. Systematic UPLC-ESI-MS/MS Study on the Occurrence of Staurosporine and Derivatives in Associated Marine Microorganisms from *Eudistoma vannamei*. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 23, n. 2, p. 335–343, 2012.

BÉRDY, J. Bioactive Microbial Metabolites. **Journal of antibiotics**, v. 58, n. 1, p. 1–26, 2005.

BERRIDGE, M. V. e TAN, A. S. Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 303, n. 2, p. 474–482, 1993.

BLAST. **Basic Local Alignment Search Tool**. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. Acessado em fevereiro de 2012.

BORCHARDS, J. K. The beginnings of drug therapy: Ancient mesopotamian medicine. **Drug News Perspect.** v. 15, p. 187-192, 2002.

BRINGMANN, G. et al. Large-scale biotechnological production of the antileukemic marine natural product sorbicillactone A. **Marine drugs**, v. 5, n. 2, p. 23–30, 2007.

CAIRNS, R. a;; HARRIS, I. S. e MAK, T. W. Regulation of cancer cell metabolism. **Nature reviews. Cancer**, v. 11, n. 2, p. 85–95, doi:10.1038/nrc2981, 2011.

CHO, J. Y. et al. Isolation and Structural Determination of the Antifouling Diketopiperazines from Marine-Derived *Streptomyces praecox* 291-11. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 76, n. 6, p. 1116–1121, doi:10.1271/bbb.110943, 2012.

CLARDY, J. e WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, v. 432, n. 7019, p. 829–37, doi:10.1038/nature03194, 2004.

CALLERGARI-JACQUES, S. M. Bioestatística: princípios e aplicações. **Artmed**. ISBN: 8536311444, 9788536311449. 253 páginas. 2007.

COSTA-LOTUFO, L. V.;; WILKE, D. V. e JIMENEZ, P. C. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: histórico e perspectivas. **Quim. Nova**, v. XY, n. 00, p. 1–14, 2009.

CRAGG, G. M. e NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670–95, doi:10.1016/j.bbagen.2013.02.008, 2013.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. e SNADER, K. M. Natural products in drug discovery and development. **Journal of natural products**, v. 60, n. 1, p. 52–60, doi:10.1021/np9604893, 1997.

CRONAN JR, J. M. et al. Plant Growth Promoters Isolated from a Marine Bacterium Associated with Palythoa sp. **Natural Products Letter**, v. 11, n. 4, p. 271–278, doi:10.1080/10575639808044959, 1998.

CUEVAS, C. e FRANCESCH, A. Development of Yondelis (trabectedin, ET-743). A semisynthetic process solves the supply problem. **Natural product reports**, v. 26, n. 3, p. 322–337, doi:10.1039/b808331m, 2009.

DARROUZET, E. et al. The 49-kDa subunit of NADH-ubiquinone oxidoreductase (Complex I) is involved in the binding of piericidin and rotenone, two quinone-related inhibitors. **FEBS letters**, v. 431, n. 1, p. 34–8, 1998.

DAYHOFFIM, M. D. Atlas of protein sequence and structure. Vol. 4. **Silver Spring, MD: National Biomedical Research Foundation**. 1969.

DINSMORE, C. J. e BESHORE, D. C. Recent advances in the synthesis of diketopiperazines. **Tetrahedron**, v. 58, n. 606, p. 3297–3312, 2002.

DREWS, J. Drug Discovery: A Historical Perspective. **Science**, v. 61, n. 3, p. 124–135, 2000.

DUERDEN, J. E. Report on the actinians of Porto Rico (Investigation of the aquatic resources and fisheries of Porto Rico by the U.S Fish Commission Steamer Fich Hawk in 1899). **Bull. U.S. Fish. Comm.** v.20, p.323-372. 1902.

DUESBERG, P. et al. Cancer drug resistance: the central role of the karyotype. **Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy**, v. 10, n. 1-2, p. 51–8, doi:10.1016/j.drug.2007.02.003, 2007.

DUPONT, S. et al. Diversity and biological activities of the bacterial community associated with the marine sponge *Phorbas tenacior* (Porifera, Demospongiae). **Letters in applied microbiology**, p. 1–11, doi:10.1111/lam.12154, 2013.

ELAHWANY, A. M. D. et al. Phylogenetic diversity and antimicrobial activity of marine bacteria associated with the soft coral *Sarcophyton glaucum*. **Journal of basic microbiology**, v. 53, p. 1–9, doi:10.1002/jobm.201300195, 2013.

FARNSWORTH, N. R. et al. Medicinal plants in therapy. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 63, n. 6, p. 965–81, 1985.

FATO, R. et al. Differential effects of mitochondrial Complex I inhibitors on production of reactive oxygen species. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1787, n. 5, p. 384–392, doi:10.1016/j.bbabi.2008.11.003.Differential, 2010.

FENICAL, W. Chemical studies of marine bacteria: developing a new resource. **Chem. Rev.** v.93 , p.1673-1683. 1993.

FENICAL, W. Marine Pharmaceuticals. **Oceanografia**, v. 19, n. 2, p. 110–119, 2006.

FENICAL, W. et al. Discovery and development of the anticancer agent salinosporamide A (NPI-0052). **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 17, n. 6, p. 2175–80, doi:10.1016/j.bmc.2008.10.075, 2008.

FENICAL, W. e JENSEN, P. R. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. **Nature chemical biology**, v. 2, n. 12, p. 666–73, doi:10.1038/nchembio841, 2006.

FICHER, P. M. J. Diketopiperazines in peptide and combinatorial chemistry. **J. Pept. Sci.** 9: 9-35. 2003.

FU, P. et al. α -Pyrones and Diketopiperazine Derivatives from the Marine-Derived Actinomycete *Nocardioopsis dassonvillei* HR10-5. **Journal of natural products**, v. 74, p. 2219–2223, 2011.

FURTADO, N. A. J. C. et al. Diketopiperazines Produced by an *Aspergillus fumigatus* Brazilian Strain. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v. 16, n. 6, p. 1448–1453, 2005.

GAO, C. et al. **A new diketopiperazine from the gorgonian coral *Menella kanisa* - Natural Product Research : Formerly Natural Product Letters. Natural Product Research.** [S.l.]: Taylor & Francis. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2013.879134>>, 2014.

GATENBY, R. a e GILLIES, R. J. Why do cancers have high aerobic glycolysis? **Nature reviews. Cancer**, v. 4, n. 11, p. 891–899, doi:10.1038/nrc1478, 2004.

GERWICK, W. H. e MOORE, B. S. Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology. **Chemistry & biology**, v. 19, n. 1, p. 85–98, doi:10.1016/j.chembiol.2011.12.014.Lessons, 2012.

GLASER, K. B. e MAYER, A. M. S. A renaissance in marine pharmacology: from preclinical curiosity to clinical reality. **Biochemical pharmacology**, v. 78, n. 5, p. 440–448, doi:10.1016/j.bcp.2009.04.015, 2009.

- GUO, Q. et al. Two Cyclic Dipeptides from *Pseudomonas fluorescens* GcM5-1A Carried by the Pine Wood Nematode and Their Toxicities to Japanese Black Pine Suspension Cells and Seedlings in vitro. **Journal of nematology**, v. 39, n. 3, p. 243–7, 2007.
- HAEFNER, B. Drugs from the deep : marine natural. **DDT**, v. 8, n. 12, p. 536–544, 2003.
- HANAHAN, D. e WEINBERG, R. a. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–74, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013, 2011.
- HANAHAN, D. e WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer Review University of California at San Francisco. **Cell**, v. 100, p. 57–70, 2000.
- HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug discovery today**, v. 13, n. 19-20, p. 894–901, doi:10.1016/j.drudis.2008.07.004, 2008.
- HAYAKAWA, Y. et al. Piericidins C 7 and C 8 , New Cytotoxic Antibiotics Produced by a Marine *Streptomyces* sp . v. 60, n. 3, p. 196–200, 2007.
- HICKMAN, C. P. Jr. et al. Princípios integrados de zoologia. 11ª edição. **Editora Guanabara Koogan**. Cap. 13: 238-262. 2004.
- HU, G. P. et al. Statistical research on marine natural products based on data obtained between 1985 and 2008. **Marine drugs**, v. 9, n. 4, p. 514–25, doi:10.3390/md9040514, 2011.
- HUANG, K. C. The pharmacology of chinese herbs. **CRC Press**, 2nd ed. Boca Raton, FL. 1999.
- HUANG, R. et al. Diketopiperazines from Marine Organisms. **Chemistry & Biodiversity**, v. 7, p. 2809–2829, 2010.
- HUAYUE, L. et al. Bioactive Cyclic Dipeptides from a Marine Sponge-Associated. **Biomolecules & Therapeutics**, v. 16, p. 356–363, doi:10.4062/biomolther.2008.16.4.356, 2008.
- HUNT, B. e VINCENT, A. C. J. Scale and sustainability of marine bioprospecting for pharmaceuticals. **Ambio**, v. 35, n. 2, p. 57–64, 2006.
- HWANG, J. H. et al. Etoposide-resistant HT-29 human colon carcinoma cells during glucose deprivation are sensitive to piericidin A, a GRP78 down-regulator. **Journal of cellular physiology**, v. 215, n. 1, p. 243–50, doi:10.1002/jcp.21308, 2008.
- IMHOFF, J. F.; LABES, A. e WIESE, J. Bio-mining the microbial treasures of the ocean: new natural products. **Biotechnology advances**, v. 29, n. 5, p. 468–82, doi:10.1016/j.biotechadv.2011.03.001, 2011.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Brasil. **Ministério da Saúde**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>. Acessado em março de 2014.

JENSEN, P. R.; MINCER, T. J.; et al. Marine actinomycete diversity and natural product discovery. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 87, n. 1, p. 43–8, doi:10.1007/s10482-004-6540-1, 2005.

JENSEN, P. R.; GONTANG, E.; et al. Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. **Environmental microbiology**, v. 7, n. 7, p. 1039–48, doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00785.x, 2005.

JENSEN, P. R. e FENICAL, W. STRATEGIES FOR THE DISCOVERY OF SECONDARY BACTERIA : Ecological Perspectives. **Annual review of microbiology**, v. 48, p. 559–84, 1994.

JIANG, S. et al. Diversity of culturable actinobacteria isolated from marine sponge *Haliclona* sp. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 92, n. 4, p. 405–16, doi:10.1007/s10482-007-9169-z, 2007.

JIANG, Z. et al. Two Diketopiperazines and One Halogenated Phenol from Cultures of the Marine Bacterium, *Pseudoalteromonas luteoviolacea*. **Natural Products Letter**, v. 14, n. 6, p. 435–440, 2000.

KAIGHN, M. E. et al. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). **Invest. Urol.** 17(1): 16-23.1979.

KILIAN, G. et al. Antimicrobial activity of liposome encapsulated cyclo (L -tyrosyl- L -prolyl). **Pharmazie**, v. 66, p. 421 – 423, doi:10.1691/ph.2011.0352, 2011.

KITAGAWA, M. et al. Metabolomic identification of the target of the filopodia protrusion inhibitor glucopiericidin A. **Chemistry & biology**, v. 17, n. 9, p. 989–98, doi:10.1016/j.chembiol.2010.06.017, 2010.

LAVY, A. et al. Implementing sponge physiological and genomic information to enhance the diversity of its culturable associated bacteria. **FEMS microbiology ecology**, doi:10.1111/1574-6941.12240, 2013.

LEAL, M. C. et al. Trends in the discovery of new marine natural products from invertebrates over the last two decades--where and what are we bioprospecting? **PloS one**, v. 7, n. 1, p. e30580, doi:10.1371/journal.pone.0030580, 2012.

LI, B. et al. A bisamide and four diketopiperazines from a marine-derived *Streptomyces* sp. **Journal of Asian natural products research**, v. 13, n. 12, p. 1146–50, doi:10.1080/10286020.2011.617744, 2011.

LI, W. R. e YANG, J. H. Solid-phase synthesis of unsaturated 3-substituted piperazine-2,5-diones. **J. Comb. Chem.** 4 (2): 106-108. 2002.

LIMA, M. M. Estudo do potencial citotóxico e antimicrobiano de dois antozoários (Cnidária) dos gêneros *Protopalyhoa* e *Palythoa*. **Monografia - Ciências Biológicas da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza**. 2004.

LIN, A. et al. A new diketopiperazine alkaloid isolated from an algicolous *Aspergillus flavus* strain. **Pharmazie**. 63 (4): 323-325. 2008.

MANIVASAGAN, P. et al. Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. **Microbiological research**, doi:10.1016/j.micres.2013.07.014, 2013.

MARDIS, E. R. et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. **The New England journal of medicine**, v. 361, n. 11, p. 1058–66, doi:10.1056/NEJMoa0903840, 2009.

MARTINS, M. B. e CARVALHO, I. Diketopiperazines: biological activity and synthesis. **Tetrahedron**, v. 63, n. 40, p. 9923–9932, doi:10.1016/j.tet.2007.04.105, 2007.

MAYER, A. M. S. et al. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. **Trends in pharmacological sciences**, v. 31, n. 6, p. 255–265, doi:10.1016/j.tips.2010.02.005, 2010.

MCCLELAND K. et al. An investigation into the biological activity of the selected histidine-containing diketopiperazines cyclo(His-Pro) and cyclo(His-Try). **J. Pharm. Pharmacol.** 56 (9): 1143-1153. 2004.

MISAWA, S.; STAAL, S. P. e TESTA, J. R. Amplification of the c-myc oncogene is associated with an abnormally banded region on chromosome 8 or double minute chromosomes in two HL-60 human leukemia sublines. **Cancer genetics and cytogenetics**, v. 28, n. 1, p. 127–35, 1987.

MOLINSKI, T. F. et al. Drug development from marine natural products. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 8, n. 1, p. 69–85, doi:10.1038/nrd2487, 2009.

MOMOSE, I. et al. Mitochondrial inhibitors show preferential cytotoxicity to human pancreatic cancer PANC-1 cells under glucose-deprived conditions. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 392, n. 3, p. 460–6, doi:10.1016/j.bbrc.2010.01.050, 2010.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Applications to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods, Elsevier**. 65: 55-63. 1983.

NEWMAN, D. J. e CRAGG, G. M. Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. **Journal of natural products**, v. 67, n. 8, p. 1216–38, doi:10.1021/np040031y, 2004.

NEWMAN, D. J. e CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of natural products**, v. 75, n. 3, p. 311–35, 2012.

NIIDOME, K. et al. Abstracts of papers, 225th National Meeting of the American Chemical Society, New Orleans, LA, March 23-27, 2003. **American Chemical Society: Washington, DC**. 2003.

NOCIARI, M. M. et al. A novel one-step, highly sensitive fluorometric assay to evaluate cell-mediated cytotoxicity. **J. Immunol. Methods**. 213 (2): 157-167. 1998.

OHNISHI, S. T. et al. New insights into the superoxide generation sites in bovine heart NADH-ubiquinone oxidoreductase (Complex I): the significance of protein-associated ubiquinone and the dynamic shifting of generation sites between semiquinone and semiquinone radicals. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1797, n. 12, p. 1901–9, doi:10.1016/j.bbabi.2010.05.012, 2010.

OHNISHI, T. et al. Functional role of Coenzyme Q in the energy coupling of NADH-CoQ oxidoreductase (Complex I): Stabilization of the semiquinone state with the application of inside-positive membrane potential to proteoliposomes. **Biofactors**, v. 32, n. 1-4, p. 13–22, 2008.

OHNUKI, Y. et al. Chromosomal Analysis of Human Prostatic Adenocarcinoma Cell Lines Chromosomal Analysis of Human Prostatic Adenocarcinoma Cell Line. **Cancer research**. p. 524–534, 1980.

OLANO, C.; MÉNDEZ, C. e SALAS, J. a. Antitumor compounds from marine actinomycetes. **Marine drugs**, v. 7, n. 2, p. 210–48, doi:10.3390/md7020210, 2009.

OVENDEN, S. P. B. et al. A new diketopiperazine, cyclo-(4-S-hydroxy-R-proline-R-isoleucine), from an Australian specimen of the sponge *Stelletta* sp. **Marine drugs**, v. 9, n. 11, p. 2469–78, doi:10.3390/md9112469, 2011.

PARK, S. H. e STROBEL, G. a. Cellular protein receptors of maculosin, a host specific phytotoxin of spotted knapweed (*Centaurea maculosa* L.). **Biochimica et biophysica acta**, v. 1199, n. 1, p. 13–9, 1994.

PROKSCH, P. et al. Bioactive natural products from marine invertebrates and associated fungi. **Prog. Mol. Subcell. Biol.** 37: 117-147. 2003.

RABELO, E. F. Diversidade de micro-organismos associados a zoatódeos (CNIDARIA, ZOANTHIDAE). **Tese de doutorado em Ciências Marinhas Tropicais pela Universidade Federal do Ceará (UFC)**, p. 182, 2012.

RADJASA, O. K. et al. Highlights of marine invertebrate-derived biosynthetic products: their biomedical potential and possible production by microbial associates. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 19, n. 22, p. 6658–74, doi:10.1016/j.bmc.2011.07.017, 2011.

RATEB, M. E. e EBEL, R. Secondary metabolites of fungi from marine habitats. **Natural product reports**, v. 28, n. 2, p. 290–344, doi:10.1039/c0np00061b, 2011.

ROMANO, L. H.; PROF, O. e OSAMU, C. Estabelecimento de meios de cultura para o cultivo de *Streptomyces* isolados de sedimento marinho. **Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**. Universidade Federal de São Carlos Ce. 2009.

ROS, S. et al. Functional metabolic screen identifies 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 4 as an important regulator of prostate cancer cell survival. **Cancer discovery**, v. 2, n. 4, p. 328–43, doi:10.1158/2159-8290.CD-11-0234, 2012.

ROSA, D.; MITO, M. e TOMMONARO, G. Marine bacteria associated with sponge as source of cyclic peptides. **Biomolecular Engineering**, v. 20, p. 311–316, doi:10.1016/S1389-0344(03)00038-8, 2003.

RUDI, A. et al. Amino acid derivatives from the marine sponge *Jaspis digonoxea*. **Journal os Natural Products**, v. 57, n. 6, p. 829–832, 1994.

SALGALLER, M. L. e LODGE, P. a. Use of cellular and cytokine adjuvants in the immunotherapy of cancer. **Journal of surgical oncology**, v. 68, n. 2, p. 122–38, 1998.

SAMMES, P. G. Naturally occurring 2,5-dioxopiperazines and related compounds. **Fortschr. Chem. Org. Naturst.** v.51. p.51-118.1975.

SCHNERMANN, M. J. et al. Total synthesis of piericidin A1 and B1 and key analogues. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 36, p. 11799–807, doi:10.1021/ja0632862, 2006.

SCHULZE, A. e HARRIS, A. L. How cancer metabolism is tuned for proliferation and vulnerable to disruption. **Nature**, v. 491, n. 7424, p. 364–73, doi:10.1038/nature11706, 2012.

SEO, S. et al. Phospholipase A2 inhibitors synthesized by two entomopathogenic bacteria, *Xenorhabdus nematophila* and *Photorhabdus temperata* subsp. *temperata*. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 11, p. 3816–23, doi:10.1128/AEM.00301-12, 2012.

SHIGEMORI, H. et al. Three New Metabolites from the Marine Yeast *Aureobasidium pullulans*. **Journal of natural products**, v. 3864, n. 98, p. 696–698, 1998.

SINGH, B. et al. Saccharonol B, a new cytotoxic methylated isocoumarin from *Saccharomonospora azurea*. **Tetrahedron Letters**, v. 54, n. 49, p. 6695–6699, doi:10.1016/j.tetlet.2013.09.060, 2013.

SINGH, B. K. Exploring microbial diversity for biotechnology: the way forward. **Trends in biotechnology**, v. 28, n. 3, p. 111–6, doi:10.1016/j.tibtech.2009.11.006, 2009.

SON, B. W. et al. New cytotoxic Epidithiodioxopiperazines related to Verticillin A from a marine isolate of the fungus *Penicillium*. **Nat. Prod. Letter.** 13: 213-222. 1999.

STIERLE, a C.; CARDELLINA, J. H. e STROBEL, G. a. Maculosin, a host-specific phytotoxin for spotted knapweed from *Alternaria alternata*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 21, p. 8008–11, 1988.

SUBRAMANI, R. e AALBERSBERG, W. Marine actinomycetes: an ongoing source of novel bioactive metabolites. **Microbiological research**, v. 167, n. 10, p. 571–80, doi:10.1016/j.micres.2012.06.005, 2012.

SURUP, F. et al. Iromycins from *Streptomyces* sp. and from synthesis: new inhibitors of the mitochondrial electron transport chain. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 16, n. 4, p. 1738–46, doi:10.1016/j.bmc.2007.11.023, 2008.

TAKAHASHI, H. e TAMURA, S. Piericidin A: A new inhibitor of mitochondrial electron transport. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 25, n. 4, p. 373–377, 1966.

TAKAHASHI, N; SUZUKI, A e TAMURA, S. Piericidin A. **J. Amer. Chem. Soc.** 87: 2066. 1965.

TAMURA, S. et al. Piericidina A. **J. Agric. Biol. Chem.** 27: 576. 1963.

TCGA, T. C. G. A. R. N. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. **Nature**, v. 455, n. 7216, p. 1061–8, doi:10.1038/nature07385, 2008.

TCGA, T. C. G. A. R. N. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. **Nature**, v. 474, n. 7353, p. 609–15, doi:10.1038/nature10166, 2011.

TCGA, T. C. G. A. R. N. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. **Nature**, v. 487, n. 7407, p. 330–7, doi:10.1038/nature11252, 2012.

TEASDALE, M. E. et al. Gram-positive marine bacteria as a potential resource for the discovery of quorum sensing inhibitors. **Marine Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 722–32, doi:10.1007/s10126-010-9334-7, 2011.

TOMMONARO, G. et al. Diketopiperazines produced by the Halophilic archaeon , *Haloterrigena hispanica* , Activate AHL Bioreporters. **Microbiology Ecology**, v. 63, p. 490–495, doi:10.1007/s00248-011-9980-y, 2012.

XIAO, H. et al. Phylogenetic diversity of cultivable bacteria associated with a sea anemone from coast of the Naozhou island in Zhanjiang, China. **Wei Sheng Wu Xue Bao.** 49(2): 246-250. 2009.

WAGNER-DÖBLER, I. et al. Integrated approach to explore the potential of marine microorganisms for the production of bioactive metabolites. **Advances in biochemical engineering/biotechnology**, v. 74, p. 207–38, 2002.

WANG, D. X. et al. A facile pathway to synthesize diketopiperazine derivatives. **Tetrahedron Letter**. 43: 865-867. 2002.

WANG, P. et al. Diketopiperazine derivatives from the marine-derived actinomycete *Streptomyces* sp. FXJ7.328. **Marine drugs**, v. 11, n. 4, p. 1035–49, doi:10.3390/md11041035, 2013.

WANG, Y. et al. 2, 5-Diketopiperazines from the Marine-Derived Fungus *Aspergillus fumigatus* YK-7. **Chemistry & Biodiversity**, v. 9, p. 385–393, 2012.

WARD, A. C. e BORA, N. Diversity and biogeography of marine actinobacteria. **Current opinion in microbiology**, v. 9, n. 3, p. 279–86, doi:10.1016/j.mib.2006.04.004, 2006.

WEISBURG, W. G. et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 697–703, 1991.

WHO. **World Health Organization**. Disponível em: <http://www.who.int/en/>. Acessado em: novembro de 2013.

WILKE, D. V. et al. Cytotoxic Lipidic α -amino Acids from the Zoanthid. **J. Braz. Chem. Soc**, v. 20, n. 8, p. 1455–1459, 2009.

WILKE, D. V. et al. Pro-apoptotic activity of lipidic α -amino acids isolated from *Protopalythoa variabilis*. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 18, n. 22, p. 7997–8004, doi:10.1016/j.bmc.2010.09.027, 2010.

WOLF, D. e ROTTER, V. Major deletions in the gene encoding the p53 tumor antigen cause lack of p53 in HL-60 cells. **Cell Biology**, v. 82, n. February, p. 790–794, 1985.

YAMADA, T. et al. Leptosins O - S, cytotoxic metabolites of a strain of *Leptosphaeria* sp. isolated from a marine alga. **Heterocycles**. 63 (3): 641-653. 2004. DOI: 10.3987/COM-03-9967.

YAO, Y. et al. A new piperazine-2,5-dione from the marine fungus *Gliocladium* sp. **Pharmazie**. 62 (6): 478-479. 2007.

YOSHIDA, M. et al. Inhibitory Effects of Pesticides on Growth Cultured and Respiration of Cultured Cells. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 10, p. 313–321, 1979.

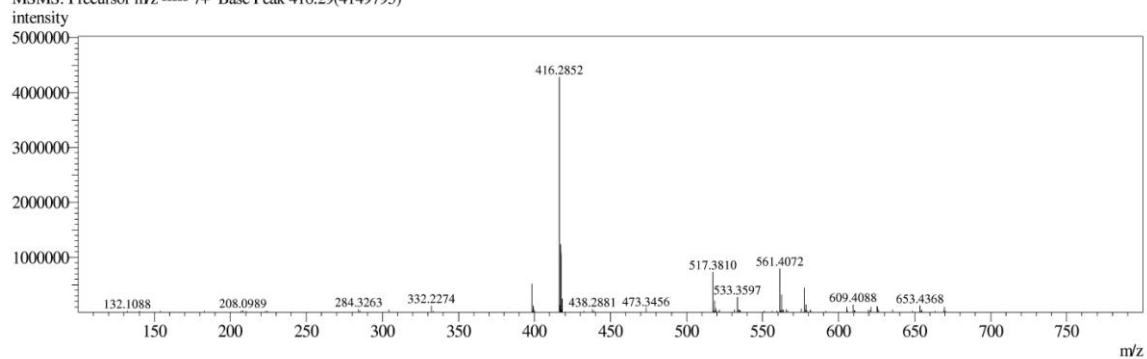
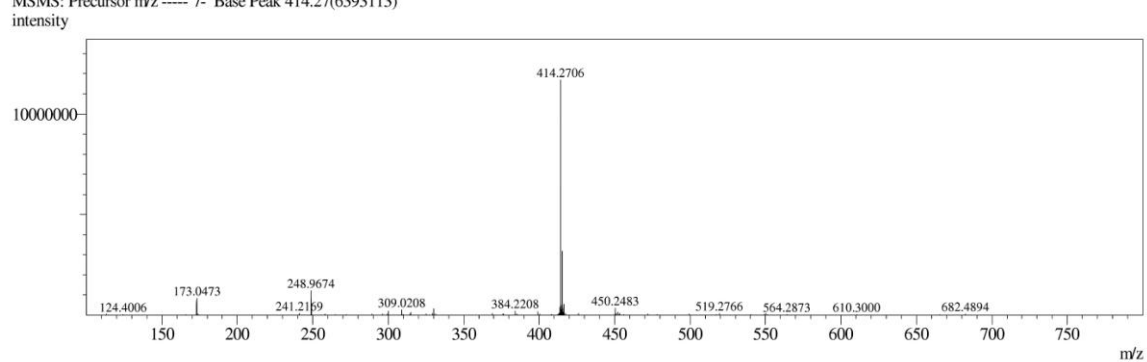
YOSHIDA, S.; SHIRAIISHI, S. e TAKAHASHI, N. The Structural Revision of Piericidin A by Combination Spectroscopic and Biosynthetic Studies. **Agric. Biol. Chem.**, v. 41, n. 3, p. 587–591, 1977.

ZHANG, L. et al. Exploring novel bioactive compounds from marine microbes. **Current opinion in microbiology**, v. 8, n. 3, p. 276–81, doi:10.1016/j.mib.2005.04.008, 2005.

ZHANG, M. et al. Cytotoxic alkaloids and antibiotic hordammarane triterpenoids from marine-derived fungus *Aspergillus sydowi*. **J. Nat. Prod.** 71 (6): 985-989. 2008. DOI: 10.1021/np700737g.

ZOTCHEV, S. B. Marine actinomycetes as an emerging resource for the drug development pipelines. **Journal of biotechnology**, v. 158, n. 4, p. 168–75, doi:10.1016/j.jbiotec.2011.06.002, 2011.

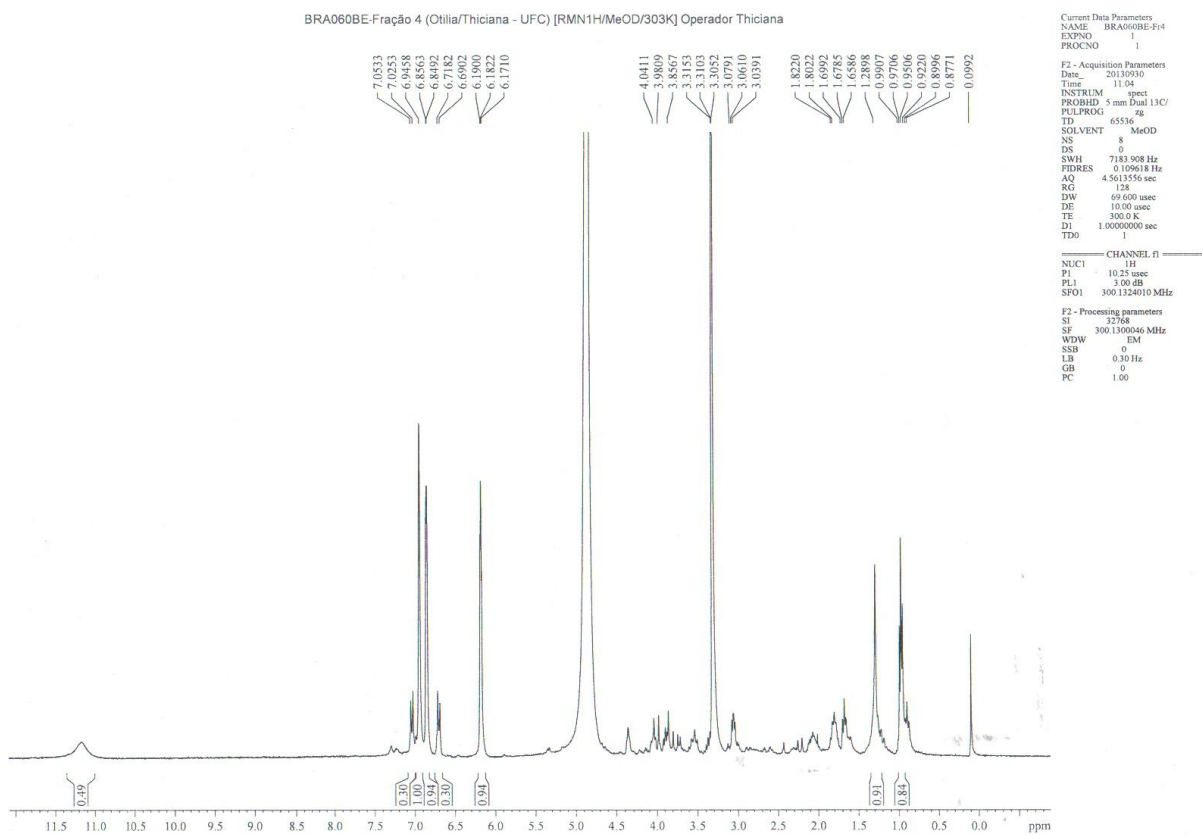
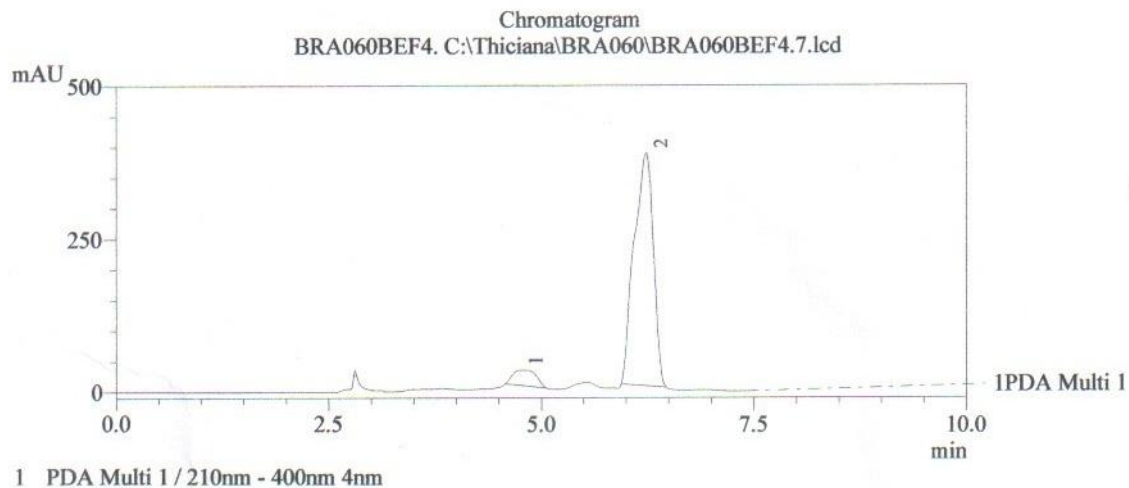
ANEXO A – Espectro HR-ESI-MS do composto “P8”

MSMS: Precursor m/z ----- /+ Base Peak 416.29(4149795)MSMS: Precursor m/z ----- /- Base Peak 414.27(6393113)

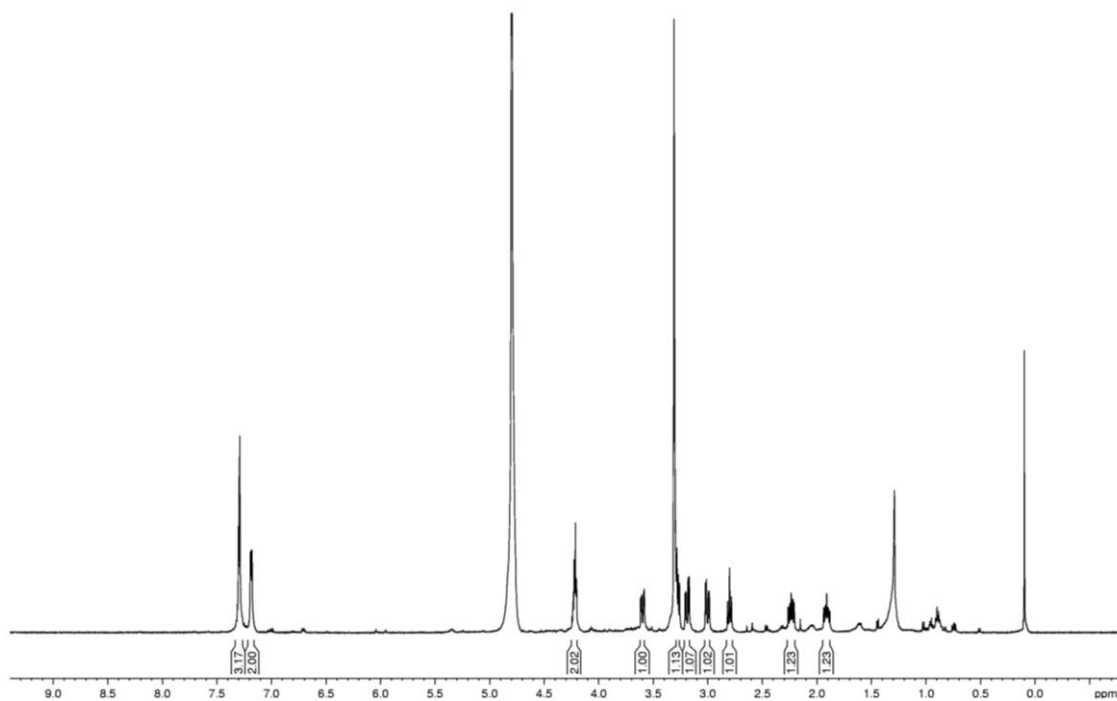
ANEXO B – Análises de C¹³ e H¹ dos dados de ressonância magnética nuclear para o composto P8

Carbon	PiericidinA		P8	
	¹³ C Chemical shift (ppm)	¹ H Chemical shift (ppm)	¹³ C Chemical shift (ppm)	¹ H Chemical shift (ppm)
1	34.5	3.37	34.5	3.37(d, $J = 6.86$ Hz)
2	122.4	5.40	122.3	5.41(t), $J = 6.96$ Hz)
4	43.2	2.78	43.2	2.79(d), $J = 6.87$ Hz)
5	126.7	5.65	126.9	5.61(dt), $J = 6.96, 15.38$ Hz)
6	135.9	6.09	135.8	6.09 (d, $J = 15.53$ Hz)
8	133.2	5.22	133.2	5.21 (d, $J = 9.58$ Hz)
9	37.0	2.65	37.0	2.68 (m)
10	82.9	3.60	83.0	3.62 (m)
12	123.3	5.50	123.8	5.49(dd, $J = 1.64, 6.82$ Hz)
13	13.1	1.63	13.3	1.63(d, $J = 5.72$ Hz)
14	10.7	1.74	10.6	?
15	17.5	0.81	17.5	0.80 (d, $J = 6.60$ Hz)
16	16.6	1.80	16.8	1.80 (d, $J = 1.28$ Hz)
17	13.1	1.58	13.3	?
1'	150.8	-	151.0	-
2'	112.2	-	112.1	-
3'	154.3	-	154.1	-
4'	128.0	-	127.9	-
5'	153.7	-	153.6	-
6'	10.5	2.08	10.6	2.09 (s)
7'	60.5	3.79	60.8	?
8'	53.0	3.93	53.2	3.95 (s)

ANEXO C - Espectro de H^1 referente a ressonância magnética nuclear e cromatograma de CLAE para a fração Fr4.



ANEXO D – Espectro de H^1 referente a ressonância magnética nuclear para o composto Fr6.



ANEXO E – Espectro de H^1 referente a ressonância magnética nuclear para o composto Fr7.

