



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

KATHARINE GURGEL DIAS FLORÊNCIO

PIERICIDINA A1 DE *Streptomyces sp* RECUPERADA DE SEDIMENTO DO
ARQUIPÉLAGO FERNANDO DE NORONHA ALTERA FENÓTIPO DE CÉLULAS
TUMORAIS

FORTALEZA - CE

2017

KATHARINE GURGEL DIAS FLORÊNCIO

PIERICIDINA A1 DE *Streptomyces sp* RECUPERADA DE SEDIMENTO DO
ARQUIPÉLAGO FERNANDO DE NORONHA ALTERA FENÓTIPO DE CÉLULAS
TUMORAIS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Diego Veras Wilke

FORTALEZA - CE

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- F654p Florêncio, Katharine Gurgel Dias.
Piericidina A1 de *Streptomyces* sp recuperada de sedimento do arquipélago Fernando de Noronha altera fenótipo de células tumorais / Katharine Gurgel Dias Florêncio. – 2017.
98 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. Diego Veras Wilke.
1. Produtos Naturais Marinhos. 2. Citotoxicidade. 3. Piericidina A1. I. Título.

CDD 615.1

PIERICIDINA A1 DE *Streptomyces sp* RECUPERADA DE SEDIMENTO DO
ARQUIPÉLAGO FERNANDO DE NORONHA ALTERA FENÓTIPO DE CÉLULAS
TUMORAIS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior
Universidade Federal do Ceará - UFC

Profª. Dra. Gláucia Maria Machado Santelli
Universidade de São Paulo - USP

AGRADECIMENTOS

À **Deus** pelo dom da vida e por ser infinitamente presente em cada momento do meu viver. Sem Ele e sem o Seu infinito amor, eu nada seria.

Aos meus queridos e amados avós, **Gerardo Dias** (*in memorian*) e **Teresinha Gurgel** pelo imenso Amor, carinho e conselhos tão preciosos. Por torcerem pela minha carreira de cientista mesmo antes de eu ingressar na universidade. Vocês são um verdadeiro exemplo a ser seguido.

Aos meus amados pais, **Maria José** (*in memorian*) e **Antônio Alves** pelo imenso Amor, pelos ensinamentos e pelos seus exemplos de que o estudo, o trabalho e a honestidade são fundamentais para a formação pessoal e profissional. Eu serei eternamente grata por tudo o que fizeram e fazem por mim.

Aos meus amados irmãos, **Caroline Mary**, **Anne Karine**, **Leandro**, **Leonardo**, por serem meus maiores amores e por serem, também, parte de mim. Por sempre me apoiarem nos momentos em que mais precisei, por torcerem por mim e compreenderem minha ausência durante o mestrado. Minha imensa gratidão a vocês quatro.

Ao meu companheiro de aventuras, e melhor bioinformata que conheço, **Alison Rebouças**, pelo amor, pelo cuidado e pelo carinho, que enchem minha vida de felicidade. Por compartilhar comigo o amor pela Ciência. Seu apoio e presença foram essenciais em todos os momentos. Obrigada por me ajudar a crescer pessoalmente e profissionalmente.

Ao meu grande orientador **Dr. Diego Veras Wilke**, por ter me recebido no Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia Marinha (LaBBMar), pela confiança que depositou em mim e por sempre me desafiar na realizações de novos trabalhos executados no laboratório, isso foi essencial para o meu amadurecimento pessoal e profissional, foi essencial também para que eu descobrisse em mim capacidades que até então eu desconhecia. Agradeço também pelo entusiasmo, paciência, incentivo, alegria e, sobretudo, pelos preciosos aprendizados. Tenho grande admiração pelo brilhante orientador que é, e muito orgulho de ser sua primeira mestranda. As conquistas que eu obtive durante essa "curta", porém intensa jornada de mestrado foram suas também!

Aos melhores amigos e companheiros de Laboratório que eu poderia ter, **Caroline Vasconcelos**, **Alexia Assef**, **Thaís Brito**, **Andréa Oliveira**, **Luciana Furtado**, **Kayanny Ferreira**, **Camila Roque**, **Felipe Teles**, **Gabriella Bruno**, **Larissa Guimarães**, **Renan Saes**, **Arinice Costa** e aos técnicos e amigos, **Msc Giovanna Riello** e o **Dr Danilo Damasceno**, pela prazerosa convivência, por compartilharem todos os momentos vividos, dentro e fora do laboratório, pelo carinho e apoio constantes, afinal nós somos uma Família! Em especial, agradeço a minha amiga querida **Erlânia Alves**, por toda a dedicação e ajuda nas largas escalas e nos SRBs, e por sempre estar disposta a me ajudar. Não há um dia que eu não agradeça por ter cada um de vocês no Laboratório comigo, e não há cansaço e desestímulo que resista ao bem estar que vocês me transmitem!

Aos indispensáveis colaboradores da química, **Profa Dra Otilia Pessoa**, sempre preocupada com o andamento dos experimentos, a aluna **Taynara Matos** pela imensa ajuda nas intermináveis rotaevaporações, e em especial ao doutorando **Francisco das**

Chagas Lima Pinto, por estar sempre disposto a ajudar e pelos importantes ensinamentos na área química.

À **Dra Letícia Lotufo** e **Dra Paula Jimenez** pelas importantes colaborações e pelo apoio de sempre. Tenho um enorme carinho e admiração pelas pesquisadoras e amigas que são.

Aos já doutores e amigos formados no LaBBMar e que já foram ganhar o mundo, **Evelyne Alves**, **Elthon Ferreira**, **Évila Dasmaceno**, **Marcionília Pimentel**, **Allyson Queiroz**, por serem as primeiras pessoas que me receberam quando entrei no laboratório. Agradeço todos os ensinamentos, paciência e o apoio que me deram.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Oncologia Experimental, em especial a **Msc Andréa Felinto**, pelos ensinamentos que foram valiosos para a execução de alguns experimentos.

A todos os amigos que contribuíram direta ou indiretamente para a minha formação profissional e pessoal. Vocês foram essenciais para que tudo desse certo!

Por fim, agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**) pela bolsa de estudo concedida, e o apoio do projeto de pesquisa PROSPECMAR, o qual este trabalho faz parte.

*À minha família,
pela mais grandiosa forma de Amor, União e Companheirismo
e por serem meu porto seguro nos momentos em que mais precisei,
dedico.*

*"Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem
foram conquistadas do que parecia impossível."
- Charles Chaplin -*

RESUMO

PIERICIDINA A1 de *Streptomyces* SP. RECUPERADA DE SEDIMENTO DO ARQUIPÉLAGO
FERNANDO DE NORONHA ALTERA FENÓTIPO DE CÉLULAS TUMORAIS

Dissertação de mestrado do Programa de pós-graduação em Farmacologia da UFC

O câncer é um grande problema de saúde e apresenta grande complexidade biológica, tornando extremamente difícil o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes para tratamento da doença sobretudo em estados avançados. Os produtos naturais desempenham um papel relevante na farmacologia pela notória contribuição para desenvolvimento de fármacos como de ferramentas farmacológicas. O sedimento marinho é uma fonte profícua de microrganismos produtores de metabólitos secundários com propriedades biomédicas e os actinomicetos, bactérias Gram-positivas, são excelentes produtores de compostos com diversas atividades biológicas. Neste trabalho, o potencial farmacológico da microbiota recuperada do sedimento marinho coletado no Arquipélago Fernando de Noronha foi investigado em células tumorais em cultura. Dezesesseis linhagens de actinomicetos foram isoladas, sendo que 7 renderam extratos brutos (EB) citotóxicos (inibição do crescimento > 75%) em células de câncer colorretal humano HCT-116. Os valores de concentração inibitória média (CI₅₀) dos EBs variaram de 0,06 a 10 µg/mL. A linhagem BRA-399, identificada como *Streptomyces* sp., apresentou a maior potência (CI₅₀ = 0,06 µg/mL) e foi selecionada para prosseguir com a purificação do princípio ativo e caracterização do efeito biológico em células tumorais. Através de um fracionamento químico bioguiado com diferentes polaridades, isolou-se a Piericidina A1 (PA1), e outras moléculas da mesma classe foram identificadas. A citotoxicidade da PA1 foi então investigada em 2 linhagens tumorais, HCT-116 e em melanoma metastático murino (B16-F10). Os ensaios do MTT, do SRB e de contagem de células e integridade de membrana por citometria foram realizados com ambas linhagens celulares para se obter um perfil de inibição da proliferação celular causado pela PA1 após 24, 48 e 72h. Os resultados mostraram inibição da proliferação celular em ambas linhagens nas concentrações mais altas testadas (entre 3,8 nM e 12 µM). Nas concentrações mais baixas (entre 0,1 aM e 24 pM) houve inibição da proliferação na linhagem HCT-116, mas não em B16-F10. Apesar da potência singular, as células tinham a integridade da membrana preservada em quase todas as concentrações, exceto a maior de 12 µM. A PA1 é um bloqueador do complexo I da cadeia transportadora de elétrons e a alteração do metabolismo energético é uma característica das células tumorais envolvida com a agressividade do tumor. A partir destas observações alguns experimentos foram realizados para avaliar a influência da PA1 na indução de alterações fenotípicas associadas à agressividade nas duas linhagens tumorais utilizadas (HCT-116 e B16-F10) na concentração de 500 fM. As células pré-tratadas com PA1 apresentaram aumento da CI₅₀ frente ao tratamento com o quimioterápico doxorrubicina. O tratamento com PA1 também aumentou a taxa de migração celular em B16-F10, bem como induziu alterações morfológicas compatíveis com células com maior atividade migratória, reforçando a hipótese de que a alteração causada pela PA1 no metabolismo da célula tumoral pode induzir alteração no fenótipo destas.

Palavras-chave: Produtos Naturais Marinhos, Citotoxicidade, Piericidina A1

ABSTRACT

PIERICIDIN A1 OF *Streptomyces* SP. RECOVERED FROM SEDIMENT OF FERNANDO DE NORONHA ARCHIPELAGO ALTERS TUMOR CELL PHENOTYPE

Master's Thesis of the Pharmacology Postgraduate Program of UFC

Cancer is a major health problem and presents great biological complexity, making it extremely difficult to develop effective therapeutic strategies to treatment of the disease, especially in advanced stages. Natural products play an important role in pharmacology because of the notorious contribution to the development of drugs as pharmacological tools. The marine sediment is a profitable source of microorganisms that produce secondary metabolites with biomedical properties, and the actinomycetes, Gram-positive bacteria, are excellent producers of compounds with diverse biological activities. In this work, the pharmacological potential of the microbiota recovered from the marine sediment collected in Fernando de Noronha Archipelago was investigated in tumor cells in culture. Sixteen actinomycete lineages were isolated, 7 of which yielded cytotoxic crude extracts (inhibition of growth > 75%) in human colorectal cancer cells HCT-116. The mean inhibitory concentration (IC_{50}) values of the crude extracts varied from 0.06 to 10 μ g/mL. The BRA-399 strain, identified as *Streptomyces* sp., presented the highest potency (IC_{50} = 0.06 μ g/mL) and was selected to proceed with the purification of the active principle and characterization of the biological effect in tumor cells. Through a bioguided chemical fractionation, Piericidin A1 (PA1) was isolated, and other molecules of the same class were identified. The cytotoxicity of PA1 was then investigated in 2 tumoral lineages, HCT-116 and in murine metastatic melanoma (B16-F10). The MTT, SRB, cell count and membrane integrity by cytometry assays were performed with both cell lines to obtain a cell proliferation inhibition profile caused by PA1 at 24, 48 and 72h. The results showed cell proliferation inhibition in both lineages at the highest tested concentrations (between 3.8nM and 12 μ M). Lower concentrations (0.1 to 24pM) inhibited proliferation in HCT-116 cells, but not in B16-F10 cells. Despite the unique potency, cells had the membrane integrity preserved at almost all concentrations, except the greater, 12 μ M. PA1 blocks the complex I of the electron transport chain, and the change in the energy metabolism is a hallmark of tumor cells involved in tumor aggressiveness. From these observations, some experiments were carried out to evaluate the influence of PA1 on the aggressiveness of tumor cells (HCT-116 and B16-F10) in the concentration of 500fM. Cells pretreated with PA1 showed an increase in IC_{50} compared to treatment with the chemotherapeutic doxorubicin. Treatment with PA1 also increased the cell migration rate in B16-F10, as well as induced morphological alterations compatible with greater migratory activity cells, reinforcing the hypothesis that the alteration caused by PA1 in the tumor cell metabolism may induce alteration in their phenotype.

Key words: Marine natural products; cytotoxicity; Piericidin A1.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição proporcional para homens e mulheres dos 10 tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para 2016	1
Figura 2 – Capacidades adquiridas pelas células tumorais e seus respectivos alvos de terapia direcionada	2
Figura 3 – <i>Salinispora tropica</i> e o composto antitumoral isolado do seu extrato, Salinosporamida A	12
Figura 4 – Planejamento experimental do presente trabalho	18
Figura 5 – Métodos empregados no isolamento das bactérias do sedimento do arquipélago de Fernando de Noronha, PE	20
Figura 6 – Método empregado na criopreservação das bactérias recuperadas do sedimento do arquipélago Fernando de Noronha, PE	22
Figura 7 - Método empregado na obtenção dos extratos do caldo de fermentação das bactérias recuperadas do sedimento do Arquipélago Fernando de Noronha, PE	23
Figura 8 – Imagens das colônias da BRA 399 em placa de ágar contendo meio A1	39
Figura 9 – Análise de <i>neighbour-joining</i> baseada em sequências do gene 16S rDNA. Números nos ramos indicam os valores de suporte de <i>bootstrap</i> acima de 70%	40
Figura 10 – Fluxograma esquemático da obtenção das frações da BRA 399 e suas respectivas inibições de crescimento em células HCT-116 pelo ensaio do MTT, 72h	41
Figura 11 – Desrepliação da fração B do extrato bruto da BRA-399	42
Figura 12 – Estrutura química do composto “P8”, identificado como Piericidina A (C ₂₅ H ₃₇ NO ₄) isolado de <i>Streptomyces sp</i>	42
Figura 13 – Curvas concentração-efeito de Piericidina A isolada de <i>Streptomyces sp</i> sobre as linhagens celulares HCT-116 e B16F10 avaliadas pelo ensaio do MTT após 24, 48 e 72 horas de incubação	43
Figura 14 – Curvas concentração-efeito de Piericidina A isolada de <i>Streptomyces sp</i> sobre as linhagens celulares HCT-116 e B16F10 avaliadas pelo ensaio do SRB após 24, 48 e 72 horas de incubação. Em A) células HCT-116 e em B) as células B16F10. Observando o eixo y - acima de zero: efeito citostático, abaixo de zero: efeito citotóxico.....	44
Figura 15 – Comparação entre os dois métodos colorimétricos utilizados para a avaliação da citotoxicidade: MTT e SRB	46

Figura 16 – Viabilidade (A e B) designada pela integridade de membrana plasmática e número de células (C) HCT-116, por citometria de fluxo, após 24, 48 e 72h de exposição em concentrações variando de 5µg/mL a 42 zg/mL	47
Figura 17 – Viabilidade (A e B) designada pela integridade de membrana plasmática e número de células (C) B16-F10, por citometria de fluxo, após 24, 48 e 72h de exposição em concentrações variando de 5µg/mL a 42 zg/mL	49
Figura 18 – Curvas concentração-efeito da Doxorubicina sobre as linhagens celulares HCT-116 (coluna A) e B16-F10 (coluna B), pré-tratadas e não-tratadas com PA1, evidenciando um aumento significativo na resistência das células pré-tratadas com PA1. Avaliação feita pelo ensaio do SRB após 72 horas de incubação.....	50
Figura 19 – Fotomicrografia de campos celulares representativos do ensaio de migração celular em células B16-F10 (melanoma murino) em 0 e 18h. Controle (DMSO) e PA1 (Piericidina A1 a 500 fM). Aumento 40X. Ensaio qualitativo. Resultado representativo de um experimento realizado em quadruplicata.....	52
Figura 20 – Contagem celular comprovando o efeito antiproliferativo da mitomicina C sobre as células B16F10, onde: C- (Controle negativo, DMSO), PA1 500fM (concentração de PA1 a 500 fM) e C- SM (Controle negativo, DMSO, sem mitomicina C). Resultado de um experimento realizado em quadruplicata.....	53
Figura 21 – As células (B16-F10) foram expostas à Piericidina A1 durante 24h. Após o período de incubação, os filamentos de actina foram corados por Faloidina. A e C : controle (DMSO a 0,4%); B , D a F : tratamentos com PA1 500 fM. Setas amarelas evidenciam a disposição dos filamentos de actina e a forma mais fusiforme das células tratadas.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Compostos isolados ou derivados de fontes marinhas aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration, EUA) ou em fase de testes clínicos.....	8
Tabela 2 - Relação proporcional de solventes utilizados para o fracionamento químico do extrato da BRA 399 e suas respectivas frações	24
Tabela 3 – Linhagens celulares tumorais utilizadas no ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> adquiridas do Banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ)	26
Tabela 4 – Colônias isoladas de bactérias recuperadas de sedimento do arquipélago Fernando de Noronha. Identificação, classificação quanto ao seu fenótipo, atividades citotóxicas dos extratos brutos, e meio de cultura do isolamento inicial	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de etila
ANOVA	Análise de Variância
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
B. O. D	<i>Biochemical Oxygen Demand</i>
CTAB	<i>Cetyltrimethyl ammonium bromide</i>
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOX	Doxorrubicina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LC/MS	<i>Liquid chromatography/mass spectrometry</i>
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazólio
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	<i>Phosphate Buffer Solution</i>
IP	Iodeto de Propídeo
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
SBF	Soro fetal bovino
SCA	<i>Starch casein agar</i>
SRB	Sulforrodamina B
SWA	<i>Seawater agar</i>
TE	<i>Tris EDTA buffer</i>
TMA	<i>Agar trace minerals</i>
UPLC	<i>Ultra-Performance Liquid Chromatography</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	O Câncer	1
1.1.1	Estratégias para o Tratamento do Câncer.....	2
1.1.2	Modelos Experimentais e Ferramentas Farmacológicas para o Estudo do Câncer.....	4
1.2	Produtos Naturais Marinhos	5
1.2.1	Microrganismos Marinhos como Fonte de Produtos Naturais	8
1.2.2	Prospecção de Produtos Naturais Marinhos no Nordeste Brasileiro	11
2	RELEVÂNCIA JUSTIFICATIVA.....	14
3	OBJETIVOS	15
3.1	Objetivo Geral	15
3.2	Objetivos Específicos	15
4	MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1	Planejamento Experimental	16
4.2	Coleta do Material e Cultivo dos Microrganismos	18
4.2.1	Preservação dos Microrganismos Isolados	20
4.2.2	Obtenção dos Extratos Brutos	21
4.3	Identificação Molecular	22
4.3.1	Extração do DNA da bactéria BRA 399	22
4.4	Cultivo em Larga Escala	24
4.4.1	Fracionamento Químico e Desreplicação	24
4.4.2	Método de Monitoramento por CLAE	25
4.4.3	Método de Monitoramento por LC/MS	25
4.5	Avaliação da Atividade Citotóxica <i>in vitro</i>	25
4.5.1	Cultivo das Células	25
4.5.2	Ensaio do MTT	26
4.5.3	Ensaio da Sulforodamina B	27
4.6	Análise dos Efeitos de PA1 sobre Linhagens Celulares Tumorais	30
4.6.1	Estudos por Citometria de Fluxo	30
4.6.2	Verificação da Integridade de Membrana.....	30
4.7	Teste de Sensibilidade a Quimioterápico	32

4.8 Ensaio de Migração por Cicatrização (Wound Healing)	33
4.9 Microscopia Confocal	35
5 RESULTADOS	37
5.1 Microrganismos Recuperados do Sedimento de Fernando de Noronha	37
5.2 Identificação Molecular da Cepa BRA 399	39
5.3 Fracionamento Químico do Extrato da BRA 399 e Desreplicação	39
5.4 Curvas de Concentração-efeito	42
5.4.1 Ensaio do MTT	42
5.4.2 Ensaio do SRB	43
5.5 Viabilidade e Número de Células por Citometria de Fluxo	46
5.5.1 Análise em células HCT-116	46
5.5.2 Análise em células B16-F10	47
5.6 Teste de Sensibilidade a Quimioterápico	49
5.7 Ensaio de Migração Celular por Cicatrização <i>in vitro</i> (Wound Healing)	50
5.8 Análise das células B16-F10 por Microscopia Confocal	52
6 DISCUSSÃO	55
7 CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
ANEXO I – SEQUENCIAMENTO DA BRA-399	81
ANEXO II – CROMATOGRAMAS DA PIERICIDINA A1	82
ANEXO III – TABELA DE CONVERSÃO DE UNIDADES DE GRAMA	84

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Câncer

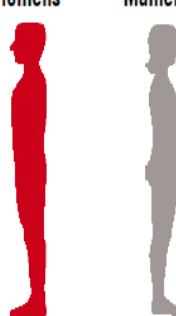
Segundo o Nacional Cancer Institute (NCI), 2016, câncer é o nome dado a uma coleção de doenças relacionadas que apresentam cunho genético, caracterizado, fundamentalmente, por mudanças que ocorrem em genes que controlam a forma como as células funcionam, crescem e se dividem.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), 8,2 milhões de pessoas morreram de câncer no ano de 2012, uma estimativa que envolve 13% de todas as mortes do mundo. Prevê-se ainda que haja um aumento de 70% de novos casos de câncer nas próximas duas décadas, totalizando 22 milhões de novos casos (WHO, 2015).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2016), a estimativa para o Brasil, no biênio 2016-2017, aponta a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer. Excetuando-se o câncer de pele não melanoma (aproximadamente 180 mil casos novos), ocorrerão cerca de 420 mil casos novos de câncer. O câncer colorretal é o terceiro câncer mais diagnosticado em homens e o segundo em mulheres, e o melanoma, apesar de ter uma baixa incidência, é o mais agressivo e letal tipo de câncer (INCA, 2016).

A **Figura 1** mostra a distribuição de ocorrência dos 10 tipos de câncer mais frequentes no país para 2016, proporcional para homens e mulheres.

Figura 1 – Distribuição proporcional para homens e mulheres dos 10 tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para 2016 (INCA, 2016).

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	61.200	28,6%			Mama feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%			Colo do útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%			Estômago	7.800	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%			Corpo do útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%			Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.380	3,0%			Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%			Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

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 celular e homeostase tecidual (HANAHAN & WEINBERG, 2011). Em 2011, Hanahan e 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 à angiogênese, evasão da apoptose e desregulação do metabolismo energético (**Figura 2**).

Figura 2 – Capacidades adquiridas pelas células tumorais e seus respectivos alvos de terapia direcionada (Adaptado de HANAHAN & WEINBERG, 2011).



1.1.1 Estratégias para o Tratamento do Câncer

O índice de mortes ligadas ao câncer continua muito elevado, apesar do avanço no conhecimento da doença e nas diferentes formas de tratamento. Em grande parte dos casos, ainda não foi possível achar uma cura.

O câncer pode ser tratado de diversas formas, e o tratamento é escolhido de acordo com o tipo de câncer e em que estágio ele está. Atualmente, os tratamentos mais

utilizados podem ser usados separada ou conjuntamente, e os mais empregados são: cirurgia, quimioterapia, radioterapia, imunoterapia, terapia dirigida, terapia hormonal, entre outros que geralmente são utilizados apenas como adjuvantes (NCI, 2015).

A imunoterapia e a terapia dirigida são técnicas mais atuais e muito caras, sendo de uso restrito, superficial e muitas vezes adjuvante. A imunoterapia é, por definição, uma técnica antineoplásica adjuvante que se baseia em anticorpos capazes de reconhecer antígenos específicos que são diferencialmente expressos na superfície de células de câncer, marcando-as como alvos (WEINER *et al.*, 2012).

A cirurgia pode ser usada como uma forma de diagnóstico, tratamento ou mesmo prevenção do câncer. Desse forma, a maioria das pessoas com câncer passará por algum tipo de cirurgia. Quando a cirurgia não é o suficiente ou não pode ser feita de imediato, os dois tratamentos mais escolhidos são radioterapia e quimioterapia (ACS, 2016).

A radioterapia é uma técnica que utiliza partículas ou ondas de alta energia para gerar a destruição ou induzir algum dano às células tumorais (ACS, 2016). Esse tipo de tratamento normalmente é utilizado em associação com a cirurgia como aumento da eficiência do tratamento, sendo um tratamento sujeito a várias limitações (ALMEIDA *et al.*, 2005). Já a quimioterapia é uma medida terapêutica de abordagem sistêmica que utiliza de uma substância ou um conjunto de várias substâncias (poliquimioterapia) para tratamento das neoplasias (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Apesar do considerável arsenal de medicamentos já existente para o tratamento de cânceres e do sucesso terapêutico em vários esquemas de tratamentos, ainda não se chegou a um composto ideal, e assim, a busca por novos fármacos ainda é uma meta prioritária para terapia de câncer, devido ao rápido desenvolvimento de resistência à múltiplas drogas quimioterápicas. Além disso, a alta toxicidade geralmente associada a quimioterapia e seus efeitos colaterais aumentam a demanda por novos medicamentos antitumorais, com menos efeitos colaterais e maior eficiência terapêutica (OLANO; MENDEZ & SALAS, 2009).

O intenso empenho da ciência para aprimorar a quimioterapia nos últimos 25 anos levou a uma melhora na taxa de sobrevivência dos pacientes, mesmo assim ainda é necessário buscar novos meios de tratamento (VANNEMAN & DRANOFF, 2012).

A cura do câncer ainda permanece como um desafio para a humanidade. Nesse sentido, a ciência não tem poupado esforços na busca de novas opções de agentes com

potenciais terapêuticos que mostrem melhor especificidade e melhor eficácia no tratamento da doença (BALDERAS- RENTERIA *et al.*, 2012).

Várias técnicas de rastreio de compostos bioativos foram e ainda estão sendo desenvolvidas para facilitar a busca por moléculas que detenham potencial farmacológico. Dentre a maioria dos produtos descobertos para uso clínico, destacam-se os agentes anticâncer e anti-infecciosos (HARVEY, 2008).

1.1.2 Modelos Experimentais e Ferramentas Farmacológicas para o Estudo do Câncer

Os modelos experimentais são de grande importância e representam o ponto de partida para a caracterização farmacológica de novos compostos para o tratamento de doenças. Desde a antiguidade, várias espécies animais foram utilizadas como modelos vivos, em estudos de situações de risco, e no desenvolvimento da indústria farmacêutica ainda no século XX (WILHELMUS, 2001). Alguns fatores foram decisivos para a substituição de grande parte dos experimentos realizados *in vivo*, pois estes testes, além de possuírem fatores limitantes como o custo dos experimentos, uso de grandes quantidades de amostras, possuem agravantes relacionados à ética animal (CRUZ *et al.*, 2004). Diante disso, o advento dos testes *in vitro* representou um divisor de águas na realização da pesquisa científica. Mesmo com algumas limitações para simular o microambiente tumoral *in vivo*, os métodos *in vitro* apresentam vantagens em relação aos *in vivo* tais como poder limitar o número de variáveis experimentais, obter dados significativos mais facilmente além do período de teste ser, em muitos casos, mais curto. Estes estudos têm por finalidade principal obter metodologias rápidas, baratas, de fácil execução e reprodutibilidade que possam ser padronizadas e validadas. Essa situação foi imprescindível para que os métodos *in vitro* alcançassem aceitação científica internacional (ROGERO *et al.*, 2003).

O processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos é complexo, longo e de alto custo, tendo suas raízes profundamente ligadas às inovações científicas e tecnológicas (GUIDO *et al.*, 2008). Os avanços expressivos da química e biologia e a melhor compreensão de vias bioquímicas, alvos moleculares e de mecanismos que levam ao aparecimento e desenvolvimento de doenças, tornaram possível a descoberta de inovações terapêuticas notáveis, proporcionando melhorias significativas na

qualidade de vida das diversas populações no mundo (SCHWARZENBERG & VOLLMAR, 2013; LINDEQUIST, 2016).

O papel central no processo de pesquisa e desenvolvimento de fármacos (P&D), caracteriza-se por seu relevante caráter multidisciplinar, abrangendo diversas especialidades, tais como química orgânica, bioquímica, farmacologia, informática, biologia molecular, estrutural, entre outras (GUIDO *et al.*, 2010; LINDEQUIST, 2016).

Cientistas da área básica tornam disponíveis aos pesquisadores clínicos não só novas ferramentas farmacológicas para uso em pacientes e novas formas de avaliar o desempenho dos mesmos, mas também novas possibilidades de avaliar o prognóstico destes pacientes. Por sua vez, o pesquisador clínico registra novas observações sobre a natureza e a progressão da doença, estimulando assim novos projetos da área básica. Esta interação complementar entre as áreas básica e clínica se dá principalmente pela efetivação de laboratórios de pesquisa translacional multidisciplinares (INCA, 2016).

Alguns fármacos já utilizados na clínica médica são também utilizados como ferramentas farmacológicas, como por exemplo, o endoxifeno, utilizado no tratamento do câncer de mama (PONCIANO *et al.*, 2012); mitomicina C, usada para tratamento de ablação corneana (WALLAU *et al.*, 2005); doxorubicina, utilizada no tratamento do câncer de mama (INCA, 2016) entre outros.

A natureza é uma ampla fonte de inspiração e recursos para a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos. A farmacologia se apoia densamente na utilização de inovações obtidas pelo homem para o seu benefício, através do uso, síntese ou modificação das moléculas sintetizadas pelos seres vivos, *i.e.*, os produtos naturais. Estima-se que 80% dos fármacos utilizados atualmente são produtos naturais ou são derivados dos mesmos, por isso se destaca a privilegiada posição ocupada pelas substâncias sintetizadas pelos seres vivos na busca por moléculas com atividade biológica (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2009; SCHWARZENBERG & VOLLMAR, 2013; DELGADO *et al.*, 2013 ; LINDEQUIST, 2016).

1.2 Produtos Naturais Marinhos

O ecossistema marinho representa 95% da biosfera e, dos 31 filos animais conhecidos, 12 são exclusivamente marinhos e nunca foram encontrados além dos oceanos. Os ecossistemas disponibilizaram produtos naturais extraordinários, os quais foram utilizados diretamente ou após modificações químicas, para o desenvolvimento

de novos fármacos (BOEUF, 2011). No entanto, o potencial farmacêutico do ambiente marinho, em grande parte foi negligenciado até meados do século passado e, até o presente momento, a biodiversidade encontrada nesse ambiente ainda permanece em grande parte inexplorada (ROBERTS, 2002; BOEUF, 2011).

Mais de 100 novos produtos estão em desenvolvimento clínico, particularmente como agente anticâncer e anti-infecciosos. 13 novos fármacos relacionados a produtos naturais foram aprovados entre 2005 e 2007, cinco representam novas classes de fármacos, incluindo os produtos marinhos Dolastatina (Adcetris[®]), trabectedina (Yondelis[®]) e ziconotídeo (Prialt[®]) (HARVEY., 2008, NEWMAN e CRAGG., 2016).

Outros exemplos de compostos de origem marinha, em estágio de triagem clínica são: a briostatina isolada de *Bulgula neritina*, um briozoário, a halicondrina E7389, um derivado da halicondrina B, isolado da esponja *Halichondria okadai* por Hirata e Uemura (1986), o HTI-286 um análogo sintético do tripeptídeo hemiasterlina, obtido da esponja *Hemiasterella minor* por Loganzo *et al.* (2003), a aplicidina, um análogo do composto didemnina, isolado do tunicato *Aplidium albicans*, e KRN7000 um derivado sintético de um esfingolipídeo isolado de *Agelas mauritanus*, uma espécie de esponja (NEWMAN & CRAGG., 2016).

Os produtos de origem marinha possuem um papel de grande valor na descoberta de novas drogas, tornando-os evidentes particularmente no que se refere ao câncer, onde cerca de 60% das drogas em uso clínico provém de origem natural (CRAGG *et al.*, 2009). Além das clássicas fontes terrestres como as plantas e o solo, um campo que vem se destacando é a pesquisa com produtos naturais de origem marinha. O ambiente marinho tem provado ser uma fonte rica em compostos extremamente potentes, que possuem atividades relevantes demonstradas, como antitumorais, anti-inflamatórias, analgésicas, imunomodulatórias e alérgicas. Sendo assim, há um número significativo de moléculas importantes derivadas de fontes marinhas, ou que foram sintetizadas a partir de um composto marinho (NEWMAN & CRAGG, 2004).

Os ecossistemas presentes nas profundezas marinhas representam cerca de 65% da superfície do planeta e possuem um importante papel na produção de biomassa e nos ciclos biogeoquímicos em uma escala global. Todos esses processos são mediados pela microbiota bentônica, as quais utilizam detritos orgânicos para a produção de biomassa e respiração (TURLEY & DIXON, 2002). Sendo assim, os sedimentos marinhos se configuram como importante matriz biológica e tem grande relevância na ecologia dos sistemas marinhos. Devido à essa grande importância e complexidade, tanto os

sedimentos marinhos, quanto a sua microbiota associada têm sido objeto de inúmeros estudos ao longo dos últimos 50 anos, especialmente na última década. Os critérios mais comumente explorados nos sedimentos são a diversidade bacteriana, biomassa e atividade metabólica. Já existem diversos métodos que podem ser utilizadas na análise da atividade microbiana em sedimentos. O uso otimizado dessas técnicas será muito útil para um maior entendimento do papel desenvolvido pelos organismos procariotos nos oceanos do Brasil e do mundo (CARVALHO & PARANHOS, 2010).

O ambiente marinho corresponde, provavelmente, a última grande fronteira para a prospecção farmacológica de produtos naturais. Este ambiente, que cobre cerca de 70% da superfície da Terra e compõe mais de 90% do volume de sua crosta, e, segundo especialistas, dotado de ecossistemas, como os recifes de corais ou o assoalho profundo, que apresentam biodiversidade superior à das florestas tropicais (LAM, 2006).

A complexidade do acesso a esse ambiente, principalmente devido às suas profundidades, adiou a sua exploração, escapando do interesse dos cientistas de produtos naturais até os anos 50. Com o avanço das técnicas e o advento dos equipamentos seguros de mergulho, na década de 70, algas e invertebrados marinhos puderam dar início às suas histórias nas bancadas dos laboratórios de química e farmacologia (FENICAL, 2006).

Os estudos iniciais em busca de novos produtos naturais se concentraram, inicialmente, em invertebrados marinhos como ascídias, esponjas, corais, moluscos, briozoários e sedimentos, além das algas. Inúmeros estudos comprovam a importância dos invertebrados marinhos como fonte de novos compostos de interesse e aplicação biomédica. Em diversos casos, a síntese química de compostos bioativos mostrou-se muito difícil de ser obtida racionalmente, devido à complexidade das moléculas. Além disso, não é econômica nem ecologicamente viável de obter estes compostos diretamente dos organismos hospedeiros. Dessa forma, a prospecção de compostos com potencial biomédico a partir de microrganismos surge como uma solução sustentável para a exploração dos recursos marinhos como fonte de novos fármacos (NEWMAN & CRAGG, 2004; NEWMAN & CRAGG., 2016).

Tabela 1 - Compostos isolados ou derivados de fontes marinhas aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration, EUA) ou em fase de testes clínicos (GERWICK e MOORE, 2012; MAYER *et al.*, 2010; WATERS *et al.*, 2010). N.A., não aplicável.

Status	Composto	Nome	Organismo fonte	Classe química	Aplicação
--------	----------	------	-----------------	----------------	-----------

clínico	comercial		terapêutica		
Aprovado	Cítarabina, Ara-C	Cytosar-U	Esponja/bactéria	Nucleosídeo	Câncer
	Vidarabina, Ara-A	Vira-A	Esponja/bactéria	Nucleosídeo	Antiviral
	Ziconotídeo	Prialt	Mesilato	Peptídeo	Dor
	Trabectedina, ET-743	Yondelis	Ascídia/bactéria	Alcalóide	Câncer
	Brentuximab vetodin	Adcetris	Molusco/ cianobactéria	Anticorpo conjugado a droga	Câncer
Fase III	Plitidepsina	Aplidin	Ascídia/bactéria	Depsipeptídeo	Câncer
	Soblidodina, TZT-1027	N.A.	cianobactéria	Peptídeo	Câncer
Fase II	PM00104	Zalypsis	Molusco	Alcalóide	Câncer
	Glembatumumab Vedotin, CDX-011	N.A.	Molusco/bactéria	Anticorpo conjugado a droga	Câncer
	DMXBA, GTS-21	N.A.	Nemertíneo	Alcalóide	Esquizofrenia
	Plinabulina, NPI- 2358	N.A.	Fungo	Dicetopiperazina	Câncer
	Elisidepsina, PM1004	Irlavec	Molusco/bactéria	Depsipeptídeo	Câncer
Fase I	SGN-75	N.A.	Molusco/ Cianobactéria	Anticorpo conjugado a droga	Câncer
	ASG-5ME	N.A.	Molusco/ Cianobactéria	Anticorpo conjugado a droga	Câncer
	Briostatina 1	N.A.	Briozoário/ proteobactéria	Policetídeo	Câncer, Alzheimer
	Hemiasterlina, E7974	N.A.	Esponja/bactéria	Tripeptídeo	Câncer
	Salinosporamida A, NPI-0052	Marizomib	Bactéria	β -lactona- γ - lactâmico	Câncer

1.2.1 Microrganismos Marinhos como Fonte de Produtos Naturais

As bactérias marinhas consistem numa importante fonte de recursos genéticos com fins biotecnológicos, mas apesar dessa relevância, os oceanos ainda são um dos mais significantes e menos compreendidos ambientes naturais habitados por microorganismos no planeta (MARTIN-CUADRADO *et al.*, 2007).

O potencial biotecnológico dos microrganismos aparenta ser praticamente ilimitado. Um único microrganismo pode fornecer vários compostos bioativos diferentes quando submetido a diferentes condições de fermentação e, mais além, com o incremento das mais recentes técnicas genômicas e análises das vias metabólicas, é

possível abrir um leque de múltiplas vias crípticas induzíveis para a produção de várias outras moléculas orgânicas (HILL & FENICAL, 2010).

Na tentativa de aumentar o arsenal de moléculas com potencial aplicação terapêutica e incorporar sustentabilidade ao processo de pesquisa e desenvolvimento de fármacos de origem marinha, os microrganismos passaram a ser amplamente estudados (FENICAL & JENSEN, 2006).

Com relação a microbiota, estima-se que são encontrados 10^6 microrganismos por mililitro na água do mar e 10^9 por centímetro cúbico no sedimento marinho (FENICAL & JENSEN, 2006). Cosmopolitas como são, os microrganismos são capazes de colonizar praticamente qualquer ambiente marinho, inclusive regiões de condições extremas de temperatura, salinidade e pressão, permitindo, assim, uma vasta exploração em diferentes ambientes. Mais além, em meio a diversidade da macrofauna, encontram-se ainda excelentes hospedeiros, também muito ricos em nutrientes, com os quais os microrganismos marinhos desenvolvem relações de simbiose e epibiose (FENICAL & JENSEN, 2006).

Para sobreviverem ao ambiente marinho, onde as pressões ecológicas são, genericamente, mais intensas que no ambiente terrestre, os microrganismos marinhos desenvolveram um aparato metabólico peculiar, que também lhes proporcionou um recurso para a produção de metabólitos nunca antes observados para organismos terrestres (FENICAL, 1993).

Durante os últimos 70 anos, os actinomicetos e, em particular, aqueles pertencentes ao gênero *Streptomyces*, têm sido conhecidos como produtores prolíficos de novos compostos bioativos, inclusive de drogas antitumorais. Os actinomicetos são bactérias Gram-positivas, geralmente filamentosas, conhecidas pela sua capacidade inigualável de produção de metabólitos secundários com diversas atividades biológicas. São caracterizadas por um ciclo de vida complexo, que representam uma das maiores unidades taxonômicas dentre as 18 principais linhagens atualmente reconhecidas dentro do domínio Bactéria (LI *et al*, 2016).

As actinobactérias são amplamente distribuídas em ecossistemas terrestres e aquáticos, e, no solo, desempenham um papel crucial na reciclagem da biomassa (OLANO; MENDEZ & SALAS, 2009). Ao lado de vários fármacos encontrados a partir de triagens de moléculas naturais nas décadas de 40 a 60, a estreptomicina foi isolada de *Streptomyces griseus*, sendo o primeiro e um dos principais representantes da classe de antibióticos aminoglicosídeos (GUIMARÃES; MOMESSO & PUPO, 2010).

Os actinomicetos são considerados uma importante fonte de compostos bioativos, produzindo antibióticos e enzimas que possuem diversos efeitos clínicos. Estima-se que cerca de 50% dos antibióticos naturais são produzidos por actinomicetos, dentre eles, os actinomicetos marinhos. Esses compostos possuem atividades antibacterianas, antifúngicas e anti-inflamatórias. Apesar dessas descobertas, os estudos relacionados a actinomicetos ainda são muito limitados (RAVIKUMAR; FREDMOSES & GNANADESIGAN, 2012).

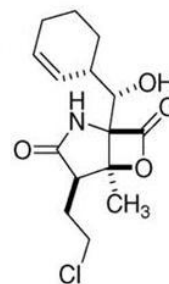
Dentre os protótipos de fármacos obtidos de microrganismos marinhos, destaca-se a salinosporamida A, isolada do actinomiceto *Salinispora tropica* (**Figura 3**), que foi descrita pela primeira vez pelo grupo do Dr. William Fenical no *Scripps Institution of Oceanography*, em 2003 (FELING *et al.*, 2003, MALDONADO *et al.*, 2005). Esse composto, foi encontrado através de triagem de extratos obtidos de bactérias marinhas, e apresenta uma potente citotoxicidade *in vitro*, efeito resultante da sua específica interação com a subunidade 20S do proteassomo (FENICAL & JENSEN, 2006). A salinosporamida A se destacou muito por ter sido a substância a percorrer mais rapidamente a fase de testes pré-clínicos: desde a sua descoberta até o início dos testes clínicos contam-se apenas três anos. Apesar do interesse da comunidade química na síntese desse composto, que apresenta uma estrutura com alto grau de funcionalidade e baixo peso molecular (REDDY *et al.*, 2004; ENDO & DANISHEFSKY, 2005), todo o suprimento para os testes clínicos é obtido através da fermentação da *S. tropica*. Várias rotas de síntese foram descritas, entretanto a fermentação ainda permanece como o método de obtenção de melhor relação custo-benefício. Esse é o primeiro exemplo de um fármaco que entrou em testes clínicos com suprimento totalmente dependente da fermentação marinha (FENICAL *et al.*, 2009), o que inspirou muitos outros pesquisadores que trabalhavam com microrganismos de origem marinha.

Figura 3 – *Salinispora tropica* (A) e o composto antitumoral isolado a partir do seu extrato, Salinosporamida A (B).

A)



B)

Fonte: MALDONADO *et al.*, 2005

1.2.2 Prospecção de Produtos Naturais Marinhos no Nordeste Brasileiro

O Brasil possui um litoral contínuo de cerca de 8.500 km de extensão e reserva um grande potencial para a descoberta de substâncias de interesse médico e farmacológico. Apesar deste potencial, muitas regiões marinhas pertencentes ao território brasileiro permanecem sub-exploradas pelos grupos que estudam produtos naturais, contando com apenas alguns estudos, sendo, a sua maior parte, com os invertebrados que habitam estas regiões.

Trabalhos de *screening* também ressaltam o potencial biomédico das espécies desta região, dessa vez, considerando as esponjas. O primeiro estudo consistiu em um *screening* de extratos hidroalcoólicos de oito esponjas encontradas na zona intertidal na praia de Flexeiras (Trairi), onde se avaliou seus potenciais citotóxicos e antimicrobianos (JIMENEZ *et al.*, 2004). Em 2007, Ferreira e colaboradores publicaram um *screening* para atividade citotóxica e antimetabólica de extratos hidroalcoólicos de 22 espécies de esponjas coletadas no Parque Estadual Marinho Pedra da Risca do Meio, Ceará, onde foram encontradas nove espécies citotóxicas para linhagens celulares tumorais (FERREIRA *et al.*, 2007). Mais além, a investigação do extrato de dois corais populosos da costa cearense, mostrou que estes eram extremamente citotóxicos contra células tumorais *in vitro* (LIMA-FILHO, 2004).

Vale destacar que espécies selecionadas nestes estudos de triagem, como a esponja *Monanchora arbuscula* (FERREIRA *et al.*, 2011) e o zoantídeo *Protopalythoa variabilis* (WILKE *et al.*, 2010; WILKE *et al.*, 2009), prosseguiram em estudos químicos e farmacológicos, resultado no isolamento de moléculas inéditas com mecanismos de ação interessantes.

A pesquisa com microrganismos marinhos na costa brasileira ainda é extremamente recente e principiante, com algumas iniciativas pontuais. No Ceará, em 2006, foram iniciados estudos sobre o potencial biomédico dos microrganismos marinhos encontrados no litoral cearense. A partir de uma amostra de sedimento coletada na Praia da Taíba, localizada a cerca de 60 km de Fortaleza (CE), foram isoladas 32 cepas de bactérias das quais 13 tiveram seus extratos avaliados quanto a citotoxicidade (JIMENEZ *et al*, 2012).

Estudos recentes realizados com bactérias recuperadas de sedimento do arquipélago de São Pedro e São Paulo resultaram em um total de 224 extratos, onde 41 deles apresentaram atividade citotóxica contra a linhagem de cólon retal humano, mostrando o potencial farmacológico e a rica biodiversidade encontradas nas ilhas oceânicas (HCT-116) (FERREIRA *et al*, 2016).

Um outro estudo relevante focou nos microrganismos recuperados de sedimentos coletados na Praia da Pedra Rachada, no município do Paracuru, Ceará. Neste trabalho, os extratos brutos obtidos a partir dos 26 actinomicetos recuperados do sedimento dessa praia, foram testados quanto a sua citotoxicidade em células tumorais em cultura. Os extratos brutos das 26 cepas foram testados, e destes, 16 causaram inibição de 65% do crescimento das células testadas. Uma das cepas escolhidas, foi reconhecida como produtora de diversas moléculas do grupo das cromomicinas, de onde a cromomicina A2 foi isolada. Esta substância mostrou-se bastante citotóxica contra diversas linhagens de células tumorais e, particularmente em células MALME-3M, induzindo alterações no ciclo celular, possivelmente autofagia e morte celular (GUIMARÃES *et al.*, 2014). Esse estudo destacou os actinomicetos da costa do Ceará como uma importante fonte de substâncias com potencial anticâncer.

Tendo em vista um conjunto de fatores como o alto potencial biotecnológico do ambiente marinho brasileiro em um cenário de escassez de grupos de pesquisa de produtos naturais marinhos (PNM) e trabalhos nos mares do país, alinhada com a nossa inserção em uma rede de pesquisa multidisciplinar comprometida com o ambiente marinho (SISBIOTA MAR, sisbiota.ufsc.br) estruturada para dar suporte a toda a parte logística bem como para discussão científica dos projetos, procurou-se ampliar as áreas de pesquisas e para novas descobertas, e surgiu a ideia de realizar pesquisas semelhantes às realizadas na costa cearense, em outras localidades. A área escolhida foi o arquipélago Fernando de Noronha, que está localizado à 400 km da costa brasileira. Este arquipélago é formado por vinte e uma ilhas, numa extensão de 26 km², tendo uma

principal, a maior de todas também chamada "Fernando de Noronha", que ocupa cerca de 90% da área total do arquipélago. Embora essa ilha possua apenas cerca de 17 km², ela apresenta uma razoável variedade litológica (OLIVEIRA *et al.*, 2011). O arquipélago, juntamente com os Rochedos de São Pedro e São Paulo, o Atol das Rocas, as Ilhas de Trindade e Martim Vaz, compõe as chamadas ilhas oceânicas brasileiras, as quais possuem rica biodiversidade e permanecem muito pouco exploradas quanto ao potencial farmacológico e biotecnológico (BATISTELLA, 1993). Fernando de Noronha é parte de uma cadeia de montanhas submarina que se estende para leste, a partir da costa de Pernambuco (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

A geração de informações técnico-científicas acerca das características biológicas e físicas dos ambientes insulares tem se intensificado na última década (BATISTELLA, 1993; TEIXEIRA *et al.*, 2003), porém tanto o Distrito Estadual pernambucano, como o Parque Nacional Marinho ainda não dispõem de conhecimento suficientes dos tipos de solos que integram a paisagem, nem do comportamento desses perante a necessidade da conservação e, ou, preservação desse complexo turístico-ecológico (RIBEIRO *et al.*, 2005). Diante desse fato, faz-se necessário a ampliação de estudos sobre a composição dos sedimentos do arquipélago, assim como estudos sobre a microbiota presente nos mesmos.

O presente trabalho está inserido no contexto de um estudo mais amplo que visa explorar de modo sustentável o potencial biotecnológico dos sedimentos marinhos encontrados no arquipélago Fernando de Noronha, no sentido de promover a descoberta de novos compostos com potencial biotecnológico a partir de actinomicetos dali recuperados. Os estudos nesta área são considerados estratégicos por envolver o conhecimento da biodiversidade num sentido amplo, além de fontes renováveis de substâncias com importância biomédica, bem como a busca por compostos bioativos que possam ser utilizados como ferramentas farmacológicas, proporcionando uma melhor compreensão de vias bioquímicas, alvos moleculares e de mecanismos que levam ao surgimento e progressão de doenças, tornando possível a descoberta de inovações terapêuticas importantes e influenciando de forma positiva para melhorias significativas na qualidade de vida das diversas populações no mundo.

2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

O câncer é a principal causa de morte por doença nos países desenvolvidos e a segunda principal causa de morte nos países em desenvolvimento. Estima-se que, nas próximas duas décadas cerca de 22 milhões de novos casos ocorrerão no mundo. No Brasil e no mundo, o câncer possui grande relevância pelo perfil epidemiológico que essa doença vem apresentando, e, dessa forma, grandes esforços estão sendo realizados para se ter um maior entendimento sobre essa doença.

Apesar do considerável arsenal de drogas já existentes para o tratamento do câncer, em muitos casos, o sucesso terapêutico não é alcançado por causa de falhas nos esquemas de tratamento, altos índices de recidivas, redução da sobrevida dos pacientes e do grande número de efeitos adversos, o que leva a uma contínua busca por novos fármacos.

Os microrganismos marinhos têm dado uma importante contribuição para o arsenal da terapia contra diversos tipos de doenças nas últimas décadas, seja por seus produtos naturais ou por compostos derivados, desenvolvidos com êxito para uso clínico, inclusive para neoplasias que demandam novos tratamentos, para tumores refratários à quimioterapia convencional ou para estágios avançados da doença.

Dentre os microrganismos marinhos, os actinomicetos se mostram como uma relevante fonte de metabólitos secundários com importância clínica, hoje empregado como antibacterianos, antitumorais, anti-inflamatórios e antifúngicos. Em busca desse considerável potencial farmacológico e biotecnológico, nos últimos anos a busca por actinomicetos dos sedimentos marinhos, vem ganhando força em várias pesquisas ao redor do mundo.

O entendimento sobre os mecanismos de ação envolvidos no câncer, pode ajudar a superar a resistência exibida por diferentes espécimes tumorais, por exemplo.

Os produtos de microrganismos marinhos podem ser, portanto, uma fonte importante de novas moléculas que podem ser utilizadas na terapêutica, em terapia combinada com outros agentes quimioterápicos, bem como servirem como ferramentas farmacológicas, dando uma grande contribuição para o melhor entendimento das vias metabólicas relacionadas ao surgimento e progressão tumoral.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

▪ Realizar o estudo químico e farmacológico de bactérias marinhas isoladas do sedimento do arquipélago de Fernando de Noronha, visando o isolamento de substâncias com potencial biotecnológico com ênfase no câncer.

3.2 Objetivos específicos

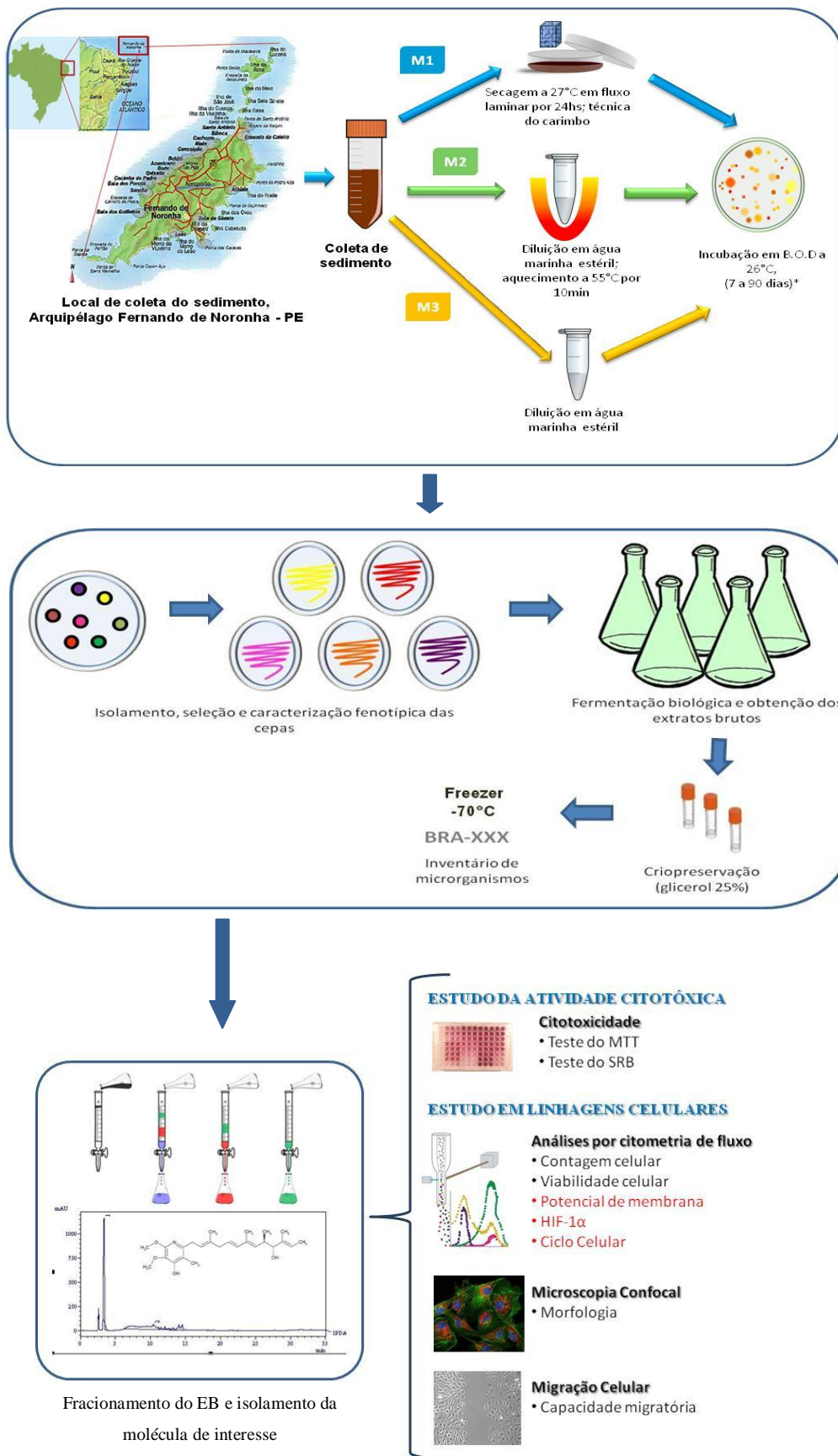
- Isolar, identificar e catalogar as bactérias isoladas a partir do sedimento coletado;
- Preparar extratos orgânicos a partir dos fermentados biológicos das bactérias;
- Avaliar as atividades biológicas em células tumorais *in vitro*;
- Realizar o fracionamento químico bioguiado de um extrato ativo selecionado;
- Isolar e identificar os metabólitos secundários com atividade biológica;
- Avaliar o efeito da molécula isolada em células tumorais *in vitro*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Planejamento Experimental

As amostras de sedimento utilizadas neste trabalho foram coletadas no Arquipélago Fernando de Noronha, localizado à 400 km da costa brasileira. As amostras obtidas foram processadas por métodos distintos, a fim de se obter as culturas bacterianas presentes no sedimento coletado. Havendo o aparecimento de culturas bacterianas, foram realizados o isolamento, seleção e caracterização fenotípica desses microrganismos. Após selecionadas as culturas de interesse, estas foram crescidas em meio de cultura líquido para a obtenção de fermentados biológicos e extratos brutos. A partir dos extratos obtidos, seguiu-se para o fracionamento, identificação e purificação dos compostos bioativos. Estes últimos serão testados quanto à sua capacidade citotóxica, sendo avaliado em seguida, os tipos de danos celulares que eles ocasionam nas linhagens tumorais testadas. A **Figura 4** resume o planejamento experimental adotado neste trabalho.

Figura 4 – Planejamento experimental do presente trabalho.



4.2 Coleta do Material e Cultivo dos Microrganismos

A amostra de sedimento marinho foi coletada no porto de Fernando de Noronha (3°51,009'S 32°26,434'O), pertencente ao distrito de Pernambuco. A coleta desse material foi realizada pelo Prof. Dr. Tito Monteiro da Cruz Lotufo, da Universidade de São Paulo. Esse trabalho faz parte de um grande projeto denominado Prospecmar-Ilhas (Prospecção Sustentável em Ilhas Oceânicas: Biodiversidade, Química, Ecologia e Biotecnologia), que objetiva realizar a prospecção de recursos biológicos nas ilhas brasileiras, visando o conhecimento de sua biodiversidade, o seu uso sustentável e o desenvolvimento de produtos e processos biotecnológicos.

O material coletado foi adequadamente armazenado em pacotes de plástico estéreis (Whirl-Pak; Nasco), e sem seguida colocados em um botijão contendo nitrogênio líquido, onde foram transportados. Ao chegar ao local onde o processamento foi realizado, as amostras foram transferidas para um ultrafreezer -70°C (MDF-U54VC, Sanyo), onde permaneceram até o seu devido processamento.

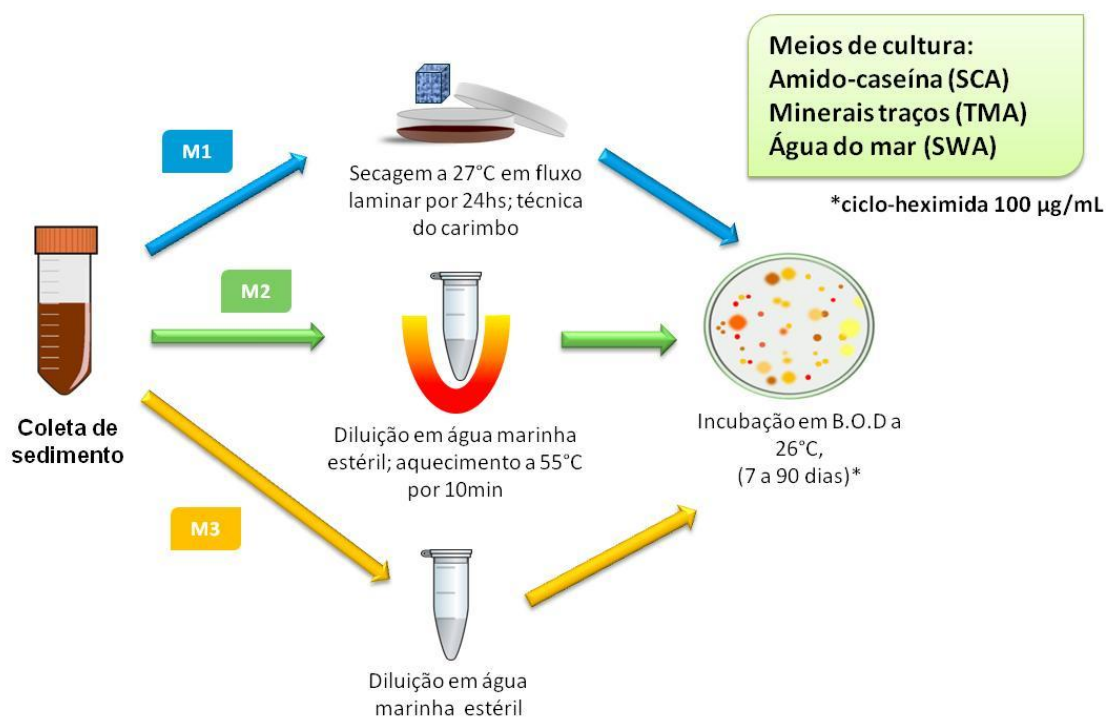
O sedimento coletado foi processado em câmara de fluxo laminar unidirecional (Filtracom, modelo MiniFlow I) por três métodos distintos, que estão ilustrados na **Figura 5**. O primeiro método (M1), consistiu em separar uma porção do sedimento em uma placa de Petri estéril e deixou-se secar por 24 horas no interior do fluxo laminar. Após esse período, com uma esponja cúbica previamente esterilizada, fez-se o contato dessa esponja com o sedimento seco e, em seguida, carimbou-se as placas de Petri contendo diferentes meios de cultura.

O segundo método (M2), consistiu em separar uma pequena porção do sedimento (aproximadamente 1,0 g) colocando-a em um microtubo contendo água do mar filtrada e estéril, que foi aquecido a 55 °C em banho seco, durante 10 minutos. Posteriormente, essa amostra recém aquecida foi homogeneizada e, para cada placa contendo diferentes meios de cultura, alíquotas de 100 µL foram estriadas com haste estéril em toda a superfície da placa. Em sua maioria, os actinomicetos são formadores de esporos aéreos bastante resistentes, por exemplo, ao calor e ao ressecamento. Esse método de aquecimento visa reduzir o aparecimento de outras bactérias que fugiam ao interesse deste trabalho.

O terceiro método utilizado (M3), consistiu em separar uma pequena porção da amostra de sedimento (aproximadamente 1,0 g), colocando-a em um microtubo contendo água do mar filtrada e estéril. Em seguida a amostra foi homogeneizada e,

para cada placa contendo diferentes meios de cultura, alíquotas de 100 μL foram estriadas com haste estéril em toda a superfície da placa. As placas seguiram para incubação em estufa incubadora de B.O.D. (CIENTEC, modelo CT-708) a 26 °C por, no mínimo, sete dias, podendo lá permanecer por até 90 dias. As placas foram observadas diariamente para a verificação do surgimento das cepas bacterianas de interesse, que seriam posteriormente isoladas.

Figura 5 – Métodos empregados no isolamento das bactérias do sedimento do arquipélago de Fernando de Noronha, PE.



Os três tipos diferentes de meios de cultura que foram utilizados nesse plaqueamento inicial, foram: o meio ágar amido-caseína (SCA) foi preparado como indicado no rótulo (HIMEDIA). O meio ágar minerais traços (TMA) foi preparado em laboratório e consiste de glicose, extrato de levedura, K_2HPO_4 , Na_2HPO_4 , KNO_3 , NaCl , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, e uma solução de metais traços, contendo $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ em água destilada com 18% de ágar. Por fim, o meio ágar água do mar (SWA) também foi preparado em laboratório e consiste de água do mar filtrada diluída a 75% em água destilada e 18% de ágar. A todos os meios sólidos foi acrescido cicloheximida 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para conter o crescimento de fungos.

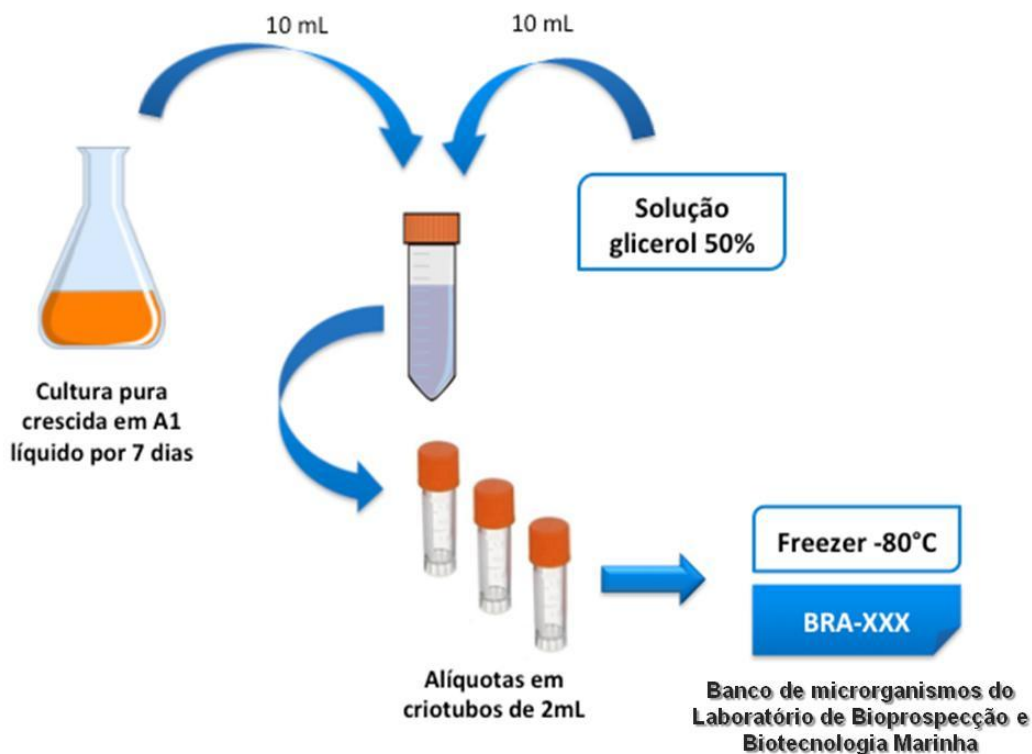
Durante o período de incubação, colônias que foram reconhecidas por suas diferenças fenotípicas (cor, brilho, forma, textura etc.) características típicas dos actinomicetos, foram selecionadas e inoculadas em uma nova placa contendo meio de cultura. A purificação desses microrganismos isolados foi realizada através de repiques sucessivos utilizando a técnica denominada esgotamento por estrias, em placas com meio sólido A1, que foi preparado em laboratório e consiste de amido solúvel, extrato de levedura e peptona (BD Biosciences), em água do mar filtrada diluída a 75% em água destilada e 18% de ágar.

Após o isolamento das colônias de interesse, cada cepa foi inoculada a partir do meio sólido para meio A1 líquido (possui a mesma composição do meio A1 sólido, porém sem a adição de ágar) de onde se procedeu a criopreservação do microrganismo (item 4.2.1 a seguir) e a extração do caldo para obtenção dos extratos brutos (item 4.2.2 adiante).

4.2.1 Preservação dos Microrganismos Isolados

Cada cepa de microrganismo isolada do sedimento coletado foi preservada a -80°C utilizando como agente crioprotetor, o glicerol. A partir da cultura líquida crescida por aproximadamente sete dias, 10 mL do fermentado foram aliquotados em tubo Falcon estéril e adicionaram-se 10 mL de solução glicerol 50% filtrada (Dinâmica), diluído em água destilada previamente autoclavada. Em seguida, esta solução foi aliquotada em tubos criogênicos de 2 mL, que foram, então, estocados em ultrafreezer -70°C (MDF-U54VC, Sanyo). As cepas congeladas passaram a compor o banco de microrganismos do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia Marinha e foram nomeadas com o código BRA seguido da numeração subsequente do banco. Esse processo está ilustrado na **Figura 6**.

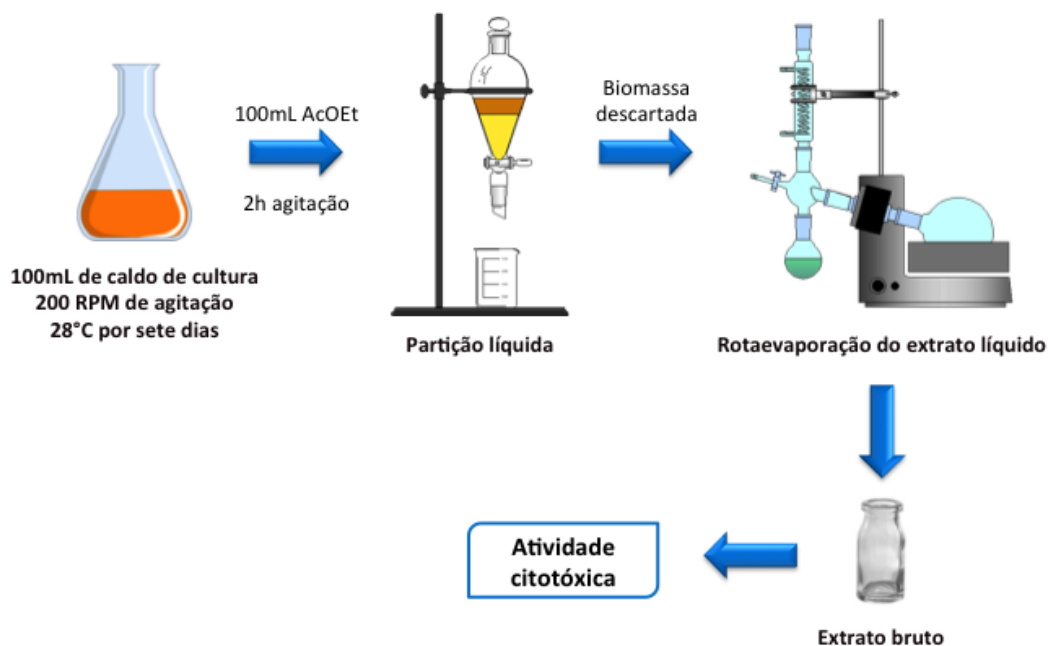
Figura 6 – Método empregado na criopreservação das bactérias recuperadas do sedimento do arquipélago Fernando de Noronha, PE.



4.2.2 Obtenção dos Extratos Brutos

Inicialmente, as culturas isoladas foram inoculadas em Erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL de meio líquido A1 e mantidos a 200 RPM de agitação (TECNAL, TE-245) e 26°C por aproximadamente sete dias. Após esse período, os meios de cultura foram extraídos com o solvente acetato de etila (AcOEt), numa proporção de 1:1, sob agitação a 100 RPM durante uma hora. Em seguida, o conteúdo de cada Erlenmeyer foi filtrado em funil de separação, os extratos líquidos foram rotaevaporados para remoção do solvente e obtenção do extrato bruto (**Figura 7**). A biomassa resultante foi descartada. Após a filtração, o extrato foi avaliado quanto a sua atividade citotóxica em células tumorais em cultura pelo ensaio do MTT (mostrado no item 4.5 adiante).

Figura 7 - Método empregado na obtenção dos extratos do caldo de fermentação das bactérias recuperadas do sedimento do Arquipélago Fernando de Noronha, PE.



4.3 Identificação molecular

4.3.1 Extração do DNA da bactéria BRA 399

A extração do DNA genômico da bactéria foi realizada utilizando o método de extração CTAB. A amostra do isolado foi obtida a partir de 1 mL do meio de cultura líquida previamente semeado com a bactéria BRA399. Esse meio de cultura foi centrifugado durante 1 minuto a 5.000 RPM a temperatura ambiente para a obtenção do *pellet*. Após a obtenção do *pellet*, o sobrenadante foi descartado e adicionado 500 μ L do tampão de lise CTAB (2% CTAB, 1,4 M NaCl, 100 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 8,0) + 5 μ g de Proteinase K + 0,5% de 2-Mercaptaetanol. A extração seguiu por meio do processo de incubação em três ciclos de congela-descongela: 10 minutos no freezer -70 °C e 10 minutos no banho seco a 60 °C. Nessa etapa, o tubo foi homogeneizado por inversão manual.

Após a homogeneização, foi adicionado 500 μ L de Fenol:Clorofórmio:Álcool-isoamílico (25mL:24mL:1mL) sendo o tubo homogeneizado por inversão manual e depois centrifugado por 10 minutos a 11.000 RPM a 4 °C. Após a centrifugação, a fase

aquosa foi transferida para um novo tubo onde foram adicionados 400 µL de clorofórmio e posterior centrifugação por 10 minutos a 11.000 RPM a 4 °C. A fase aquosa foi recuperada e transferida para um novo tubo, onde foram adicionados 300 µL de acetato de amônia 5M e 800 µL de isopropanol gelado. Depois da mistura, as soluções foram incubadas *overnight* a temperatura de -20 °C. Após a incubação foi realizada uma centrifugação a 14.000 RPM durante 30 minutos a 4 °C.

Posteriormente o sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com 200 µL de etanol absoluto gelado, e centrifugado por 10 minutos a 14.000 RPM a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* mantido à temperatura ambiente até que todo o etanol evaporasse sendo então ressuscitado em 30 µL de TE (10 mM: 1mM, pH 8,0) e mantido no freezer a -80 °C.

A reação de amplificação foi realizada utilizando os seguintes iniciadores universais para o gene 16S rDNA: 27F (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1494R (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') (HEUER *et al.*, 1997). Para a amplificação foi utilizada uma reação com volume final de 25 µL, contendo: 5 µL de gotaq Green 5X (Promega), 0,5 µL de dNTPs (10 mM), 1,0 µL de cada iniciador (10 µM), 0,125 µL taq polimerase (5U/1µL), 1 µL de DNA (10-100 ng) e água para completar o volume de reação. A reação foi realizada em termociclador C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad), utilizando o protocolo com desnaturação inicial de 95 °C por 3 minutos, seguido por 30 ciclos com: desnaturação inicial de 95 °C por 30 segundos, anelamento de 54,8 °C por 30 segundos e extensão de 72 °C por 1 minuto e por fim, extensão final de 72 °C durante 5 minutos. O produto de PCR foi corado com SYBR Safe DNA Gel Stain (Life Technologies) para a visualização em gel de agarose 1%, em corrida a 80V e 40mA, durante 40 minutos, utilizando como tampão de corrida o Tris-Borato (TBE 0,5 X). O gel foi visualizado através do *Molecular Imager Gel Doc*TM XR+ (Bio-Rad). O produto de PCR foi purificado com *ExoSAP-IT* (Affymetrix), seguindo as instruções do fabricante. A amostra foi sequenciada no Laboratório de Genética Molecular Humana – LGMH, Departamento de Genética da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE.

A sequência obtida foi visualizada e editada manualmente utilizando o software Geneious R10. Após a etapa de edição, a sequência gerada foi comparada com outras já cadastradas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), por meio da ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). O alinhamento desta e das sequências obtidas no GenBank foi realizado utilizando o

programa Clustal W. Para estas sequências foi construída uma árvore de neighbour-joining (Saitou & Nei, 1987) através do programa MEGA 7 (Kumar, Stecher & Tamura, 2016). O suporte dos ramos foi feito a partir de 1000 réplicas de *bootstrap*.

4.4 Cultivo em larga escala

A cepa BRA-399 foi selecionada para o crescimento em maior escala. Para isto, essa bactéria foi crescida em Erlenmeyers de 1 L contendo 250 mL de meio líquido A1T (meio A1 suplementado com 0,1% de CaCO_3 e soluções de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ e KBr) durante sete dias, a 150 RPM de agitação e 26°C. Para a obtenção de uma quantidade de extrato suficiente para prosseguir com os experimentos deste trabalho, foram necessárias 60 L de fermentado, que posteriormente foram extraídos e o extrato AcOEt foi rotaevaporado, resultando na obtenção de aproximadamente 1,5 g de extrato bruto.

4.4.1 Fracionamento Químico e Desreplicação

O fracionamento do extrato da BRA-399, foi feito através de cromatografia com sílica *flash*. Após a coluna montada, sílica empacotada e a amostra adicionada, seguiu-se com a adição de partições de solventes orgânicos (com polaridade crescente), e a coleta das frações foram feitas de forma separada. As partições foram seguidas de acordo com o mostrado na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Relação proporcional de solventes utilizados para o fracionamento químico do extrato da BRA 399 e suas respectivas frações.

Solventes (proporções)	Volume (mL)	Frações
100% Hexano	20	A
Hexano/Acetato de etila (3:1)	20	B
Hexano/Acetato de etila (2:1)	20	C
Hexano/Acetato de etila (1:1)	20	D
Acetato de etila 100%	20	E
Acetato de etila/Metanol (4:1)	20	F
Acetato de etila/Metanol (2:1)	20	G
Metanol (100%)	20	H

As frações foram em seguida rotaevaporadas, diluídas com DMSO (0,4 %) e testadas quanto a sua citotoxicidade. As frações ativas foram então selecionadas e uma nova cromatografia foi realizada para identificar quais moléculas existentes nas frações ativas possuíam a atividade citotóxica.

4.4.2 Método de Monitoramento por CLAE

A análise das frações obtida da BRA-399 por CLAE foram realizadas em um equipamento Shimadzu equipado com SPD-M20A diode array detector de UV-Vis. As análises foram realizadas usando coluna de fase reversa C₁₈ da 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 20µl e taxa de fluxo de 1,0 mL/min (5-95% A 0-30 minutos e 100% B 30-40 minutos), os cromatogramas foram registrados na faixa de 210-400nm.

4.4.3 Método de Monitoramento por LC/MS

As análises de LC/MS das frações obtidas da BRA-399 foram realizadas em um equipamento UPLC-QTOF usando coluna BEH de 15 cm e fase móvel composta por um gradiente CH₃CN (0,1 % Ac Fórmico) / H₂O (0,1 % Ac Fórmico) variando de 2-98% de CH₃CN em 15 minutos, com detecção nos modos positivo e negativo. Em seguida foi realizada uma consulta no banco de dados *AntiMarin*, a partir dos quais, foi possível a identificação dos principais compostos da BRA-399.

4.5 Avaliação da Atividade Citotóxica *in vitro*

4.5.1 Cultivo das células

As linhagens celulares utilizadas nos experimentos de avaliação da atividade citotóxica estão listadas na **Tabela 3** com especificações quanto à procedência e ao tipo histológico do câncer.

As células foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (Corning, 25 cm², volume de 50 mL ou 75 cm², volume de 250 mL) utilizando o meio de cultura DMEM

(Gibco) complementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina).

As culturas foram manuseadas em câmaras de fluxo laminar vertical (ESCO, modelo Airstream classe II-B2; VECO, modelo Biosafe 12 classe II) e mantidas em incubadoras de CO₂ a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ (SAYNO, modelo MCO-19AIC; NUAIRE, modelo TS Autoflow). O crescimento das culturas foi acompanhado diariamente com auxílio de microscópio óptico invertido (LABOMED, modelo TCM 400; Nikon, modelo Diaphot) e o repique para meio de cultura novo foi feito quando necessário. Para o desprendimento das células aderidas utilizou-se uma solução de tripsina-EDTA 0,5% (Gibco) diluída 10X em PBS (FRESHNEY, 2005).

Tabela 3 – Linhagens celulares tumorais utilizadas no ensaio de citotoxicidade *in vitro* adquiridas do Banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ).

Linhagem Celular	Tipo Histológico	Procedência	Concentração de plaqueamento (cél/s/mL)
HCT-116	Carcinoma de cólon	BCRJ	4,0 x 10 ⁴
B16F10	Melanoma metastático murino	BCRJ	4,0 x 10 ⁴

4.5.2 Ensaio do MTT

O ensaio do MTT pode ser utilizado para quantificação indireta das células viáveis através de uma análise colorimétrica da atividade da enzima succinil-desidrogenase presente nas mitocôndrias ativas das células vivas (MOSMANN, 1983), que se baseia na redução do sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazolina bromida (MTT), um composto de cor amarela, a formazan, de coloração púrpura, cuja absorbância pode, então, ser mensurada em espectrofotômetro.

Procedimento experimental

Neste estudo, o ensaio do MTT foi utilizado para rastrear e monitorar a atividade citotóxica dos extratos brutos das bactérias isoladas e da Piericidina A1 (a escolha dessa molécula é explicada mais adiante em resultados), em diferentes linhagens celulares. Para a realização dos ensaios, as células foram plaqueadas 24 horas antes da adição da amostra teste em placas de 96 poços na densidade de 4x10⁴ células/mL.

Em uma análise inicial, as amostras foram diluídas em dimetilsulfóxido, DMSO 0,4% (Sigma), e testadas quanto ao seu efeito antiproliferativo em células de carcinoma de cólon humano HCT-116 após 72 horas de incubação, na concentração de 5 e 50 $\mu\text{g/mL}$, em triplicata. As amostras de extratos selecionados seguiram para avaliação do efeito utilizando diluições seriadas em triplicatas de concentrações variando de 0,016 a 50 $\mu\text{g/mL}$. A Piericidina A1, por sua vez, foi testada no painel de linhagens da tabela 3, em concentrações decrescentes de 120 μM a 0,63 μM totalizando uma curva de 30 pontos, e foram incubadas juntamente com a suspensão de células em volume final de 200 μL durante 24, 48 ou 72 h, em estufa a 5% de CO_2 a 37 $^\circ\text{C}$.

Três horas após do término do tempo de incubação, o sobrenadante foi descartado e, em seguida, 150 μL da solução de MTT (Sigma) a 5 mg/mL em meio DMEM foi adicionado a cada poço da placa, que foi reincubada por mais 3 horas. Após esse período, o sobrenadante foi descartado e o precipitado de cada poço foi ressuspendido em 150 μL de DMSO e agitado até sua completa dissolução, quando pôde, então, ter as absorvâncias lidas em leitor de placa (Fisher Scientific, modelo Multiskan FC) no comprimento de onda de 595 nm.

Análise dos Dados:

Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos erros-padrão. Para as amostras testadas em triplicatas em concentrações de 5 e 50 $\mu\text{g/mL}$, a porcentagem de inibição do crescimento celular foi obtida a partir da média dos valores de absorvância convertidos em porcentagem, relativa ao controle. Para as amostras testadas em diluições seriadas, também em triplicatas, um gráfico de absorvância x concentração foi plotado para determinação da concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo (CI_{50}) e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%) a partir de regressão não-linear no programa GraphPad Prism (GraphPad Software versão 5.1).

4.5.3 Ensaio da Sulforodamina B

No ensaio da Sulforodamina B (SRB) o corante utilizado é uma aminoxantina de cor rosa brilhante, que possui dois grupos sulfônicos que são capazes de se ligar às porções terminais dos aminoácidos das células que foram fixadas com o ácido

tricloroacético (SKEHAN *et al.*, 1990). E, portanto, diferentemente do MTT, o método independe da atividade metabólica celular. Quanto maior o número de células viáveis, maior a captação do corante e maior é o valor da absorbância. Este ensaio permite também que as placas sejam estocadas, e desse modo, a leitura pode ser realizada posteriormente (HOUGHTON *et al.*, 2007; SKEHAN *et al.*, 1990).

Atualmente o método do SRB é um dos mais utilizados na rotina de triagem de drogas anticâncer pelo Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos (NCI) para uso em programas de avaliação de drogas anticâncer (FRESHNEY, 1994; RUBINSTEIN *et al.*, 1990). A superioridade do método SRB em relação ao MTT foi descrita por Keepers *et al.*, 1991.

Procedimento experimental

Para a realização desse ensaio, as células foram plaqueadas 24 horas antes da adição da amostra teste em placas de 96 poços na densidade de 4×10^4 céls/mL.

Em uma análise inicial, a amostra a ser testada foi diluída em dimetilsulfóxido, DMSO 0,4%, e testadas quanto ao seu efeito antiproliferativo em células de carcinoma de cólon humano HCT-116 e de melanoma metastático murino (B16-F10), após 24, 48 e 72 horas de incubação. A Piericidina A1, foi testada no painel de linhagens da tabela 3, em concentrações decrescentes de 120 μ M a 0,63 μ M, totalizando uma curva de 30 pontos, e foram incubadas juntamente com a suspensão de células em volume final de 200 μ L durante 24, 48 ou 72 h, em estufa a 5% de CO₂ a 37°C.

No momento em que as células foram tratadas, a placa tempo zero (não tratada) foi fixada com ácido tricloroacético (TCA) a 10%, e a placa foi reservada a uma temperatura de 4 °C por no mínimo 1h, para que em seguida pudesse ser feita a coloração com SRB.

Após o tempo de incubação, 24, 48 e 72 horas, o sobrenadante das células foi retirado e as mesmas foram também fixadas com TCA a 10%, sendo então guardadas a uma temperatura de 4°C por no mínimo 1 hora. Após o período de fixação, as placas foram lavadas 5 vezes com água destilada e em seguida esperou a secagem dos poços até que não houvesse umidade aparente. Em seguida adicionou-se 100 μ L da solução de SRB a 0,4%, e as placas então foram mantidas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C por 30 minutos. Ao término do tempo de incubação, as placas foram lavadas 5 vezes usando ácido acético a 1% para remover o excesso de SRB que não ficou ligado aos

aminoácidos celulares. Já as paredes dos poços foram limpas cuidadosamente para remover qualquer excesso de SRB que pudesse falsear o teste.

Para realizar a leitura das placas, o SRB que estava ligado aos aminoácidos fixados, foi solubilizado em 200 μL de tampão tris base 10 mM a 4°C, e homogeneizadas em mesa agitadora (shaker) por pelo menos 10 minutos, em temperatura ambiente. As absorbâncias foram lidas em leitor de placa (Fisher Scientific, modelo Multiskan FC) no comprimento de onda 564 nm ou 570 nm.

Análise do Dados

- Determinação de Proliferação Celular:

Os valores de absorbância foram normalizados em excel para $X=\log[X]$ e em seguida os gráficos de absorbância x concentração foram plotados para determinar em que concentrações a amostra foi citotóxica ou citostática, com seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%) a partir de regressão não-linear no programa GraphPad Prism (GraphPad Software versão 5.1).

As equações a seguir são utilizadas para a normalização dos resultados feitos no excel:

Se $T \geq T_0$ e $< CN \rightarrow$ efeito citostático

Fórmula: $\% \text{ proliferação celular} = 100 \times (T - T_0) / (CN - T_0)$

Se $T < T_0 \rightarrow$ efeito citocida

Fórmula: $\% \text{ proliferação celular} = 100 \times (T - T_0) / T_0$

onde T: Absorbância das células tratadas

T₀: Absorbância das células da placa tempo zero

CN: Absorbância das células do controle negativo

- Determinação de Inibição da Proliferação celular:

Para análise de inibição de proliferação celular, os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos erros-padrão. Para a análise da amostra

testada em diluição seriada, em triplicatas, um gráfico de absorvância x concentração foi plotado para determinação da concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo (CI₅₀) e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%) a partir de regressão não-linear no programa GraphPad Prism (GraphPad Software versão 5.0).

4.6 Análise dos Efeitos de PA1 sobre Linhagens Celulares Tumorais

Para os estudos do mecanismo de ação da Piericidina A1 (PA1), utilizou-se as células da linhagem de carcinoma de cólon (HCT-116) e melanoma metastático murino (B16-F10). Para os ensaios descritos a seguir, as linhagens celulares foram plaqueadas em placas de 24 poços, na concentração de 5×10^4 células/mL, e incubadas com PA1 nas concentrações de 0,1 aM; 14 aM; 24 pM; 3,8 nM e 12 μM por 24, 48 e 72h horas. O controle negativo constituiu-se de células tratadas com DMSO 0,4%.

4.6.1 Estudos por Citometria de Fluxo

A técnica de citometria de fluxo permite investigar e classificar inúmeras alterações e características de eventos biológicos em células ou outras partículas microscópicas. O citômetro possui um feixe de luz (*laser*) que incide sobre as células, à medida que elas fluem individualmente sob um fluxo hidrodinâmico, permitindo a detecção dos sinais desviados por cada célula. Os detectores são capazes de registrar desvios na dispersão linear (FSC, *Forward Scatter*) ou lateral (SSC, *Side Scatter*) da luz, além de captar a fluorescência emitida pelos marcadores utilizados, classificando as células de partículas com cada evento (GIVAN, 2004).

4.6.2 Verificação da Integridade de Membrana

Este método baseia-se na intensidade de dispersão da luz incidente sobre as células e na capacidade de o iodeto de propídeo (PI, do inglês, *Propidium Iodide*) se ligar ao DNA apenas das células cuja membrana plasmática esteja rompida, emitindo alta fluorescência vermelha quando excitado pelo *laser* (azul, neste caso, excitando a 488 nm). As células cuja membrana permanece íntegra emite uma fluorescência mais baixa, permitindo a diferenciação entre células viáveis e não viáveis.

Procedimento experimental

Após a incubação, uma alíquota de 500 µL de suspensão de células tratadas e não tratadas foi transferida para um microtubo de centrifugação de 1,5 mL, centrifugados a 1500 rpm por 2 minutos (Hettich, modelo Universal 320R) e o pellet ressuspenso em 250 µL de uma solução de PI (Sigma) a 5 µg/mL diluído em PBS. Após 15 minutos de incubação, as amostras foram lavadas com PBS para retirar o excesso de PI, e em seguida foram analisadas em citômetro de fluxo (BD, modelo Accuri C6).

Dez mil células foram contadas de cada replicata de cada grupo, com os fragmentos celulares omitidos da análise. As células foram dispostas quanto à sua dispersão linear, correlacionando ao seu volume, e dispersão lateral, correlacionando à sua granulosidade. A intensidade de emissão de fluorescência correlaciona com a integridade de membrana e esclarece a viabilidade celular. As porcentagens das células com membrana plasmática íntegra ou rompida foram analisadas usando marcadores para delimitar a população de células que predominava na região de fluorescência mais baixa e a população de células que predominava na região de fluorescência mais elevada, respectivamente, com base no controle negativo, usando o programa BD Accuri™ C6 Software versão 1.0.264.21.

Análise dos Dados

Os dados foram analisados a partir da média e dos respectivos erros padrão das médias de 3 experimentos, realizados em triplicata. Para verificação da ocorrência de diferenças entre os diferentes grupos, os dados foram analisados no programa GraphPad Prism (GraphPad Software versão 5.0). Os dados foram analisados a partir das médias e dos respectivos erros padrão das médias de 3 experimentos realizados em triplicata. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados em relação ao controle negativo por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Dunnet com nível de significância máximo de 5% ($p < 0,05$) no programa GraphPad Prism.

4.7 Teste de Sensibilidade ao Quimioterápico

O teste de sensibilidade a quimioterápico foi realizado com o intuito de verificar se a Piericidina A1 (PA1) em baixas concentrações é capaz de induzir alteração na suscetibilidade em células tumorais. O quimioterápico utilizado no presente estudo foi a Doxorubicina, um fármaco já bastante utilizado na clínica para o tratamento de alguns tipos de câncer.

Procedimento experimental

O teste foi realizado em 2 linhagens celulares, câncer de colorretal (HCT-116) e de melanoma metastático murino (B16-F10). Para a realização dos ensaios, as células foram plaqueadas 24 horas antes da adição da amostra teste em placas de 96 poços na densidade de 4×10^4 céls/mL.

Os tratamentos com Doxorubicina foram realizados em células não tratadas e em células pré-tratadas com PA1 a 500 fM por 72 horas. Para este pré-tratamento, as células foram incubadas com 500 fM de PA1 ainda em garrafa de cultura. Após as 72 horas essas células foram tripsinizadas e plaqueadas com meio suplementado com PA1 a 500 fM, para que as células estivessem em constante contato com o composto. No mesmo instante, as células que não foram pré-tratadas com PA1 também foram plaqueadas seguindo os mesmos padrões, porém com meio de plaqueamento isento de PA1. Os métodos de plaqueamento foram os mesmos utilizados para o método de SRB como descrito em sessões anteriores. As placas tempo zero foram feitas com as células pré-tratadas com PA1 e com as células não pré-incubadas.

No dia seguinte ao plaqueamento, foi realizado o tratamento das células, pré-tratadas e não pré-tratadas com PA1, com Doxorubicina para avaliação do seu efeito utilizando diluições seriadas em triplicatas de concentrações variando de 0,016 a 50 µg/mL. As células foram incubadas em estufa a 5% de CO₂ a 37 °C por 72h.

Após o término do tempo de incubação, o sobrenadante das células foi retirado e as mesmas foram fixadas com TCA a 10%, sendo então guardadas a uma temperatura de 4°C por no mínimo 1 hora. Após o período de fixação, as placas foram lavadas 5 vezes com água destilada e em seguida esperou a secagem dos poços até que não houvesse umidade aparente. Em seguida adicionou-se 100 µL da solução de SRB a 0,4%, e as placas então foram mantidas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C por 30 minutos.

Ao término do tempo de incubação, as placas foram lavadas 5 vezes usando ácido acético a 1% para remover o excesso de SRB que não ficou ligado aos aminoácidos celulares. Já as paredes dos poços foram limpas cuidadosamente para remover qualquer excesso de SRB que pudesse falsear o teste.

Para realizar a leitura das placas, o SRB que estava ligado aos aminoácidos fixados, foi solubilizado em 200 µL de tampão tris base 10 mM a 4°C, e homogeneizadas em mesa agitadora (shaker) por pelo menos 10 minutos, em temperatura ambiente. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro de placa (Fisher Scientific, modelo Multiskan FC) no comprimento de onda 564 nm ou 570 nm.

Análise dos Dados

Os gráficos de absorbância x concentração foram plotados para determinar as concentrações inibitórias da Doxorubicina, com seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%) a partir de regressão não-linear no programa GraphPad Prism (GraphPad Software versão 5.1).

4.8 Ensaio de Migração Celular por Cicatrização (Wound Healing)

A Migração celular é um fenômeno essencial para o processo de invasão e metástase. Quando realizada uma cicatriz na monocamada de células na placa, as células com alta capacidade migratória ultrapassam essa linha, tornando possível o estudo de drogas que possam interferir nesse mecanismo (BRITO *et al.*, 2005).

Procedimento experimental

O ensaio de migração celular foi baseado no modelo descrito por BÜRCK *et al* (1973), com adaptações. As células utilizadas para o ensaio, B16-F10, foram plaqueadas na concentração de $5,0 \times 10^4$ /mL em placa de 24 poços, em meio de cultura DMEM, 10% SFB, 1% antibióticos. As células foram mantidas por 24 horas em estufa, após plaqueamento, para adquirir a confluência necessária (de aproximadamente 90%). Após esse período, os poços foram tratados com 5µg/mL de mitomicina C (Sigma) por 15 minutos. O pré-tratamento com mitomicina C (antiproliferativo) garante que as células estejam migrando e não proliferando. Alguns poços contendo células não tratadas com

mitomicina C foram igualmente mantidos em meio DMEM, 0,25% de SFB e 1% de antibiótico, para servirem como controle de crescimento das células sem tratamento. Após os 15 minutos incubadas com mitomicina C, os poços foram lavados 3x com tampão salina fosfato estéril (PBS) e foi acrescentado 1 mL de meio em cada poço onde foi feita uma lesão na monocamada com a ponta da ponteira (P 200) com a formação de fendas em cruz. Essa cruz serviu como referência para a realização das fotos. Os braços verticais superiores ou inferiores foram escolhidos para as fotos. Os poços foram lavados 3x com PBS para retirar as células que se soltaram com o risco, e foi acrescentado 1 mL de meio DMEM suplementado com 0,25% de SFB, 1% de antibióticos. Em seguida as células foram tratadas com PA1 na concentração de 500 fM e para o controle negativo foi utilizado o veículo de diluição da substância (DMSO 0,4%). Logo após o tratamento, as células foram fotografadas (foto tempo zero) e em seguida a placa foi incubada a 37°C, 5% CO₂. As células foram observadas nos intervalos de tempo de 6, 12, 18 e 24 horas. O intervalo de tempo em que as células de alguns dos tratamentos quase chegaram à total confluência, foi escolhido para capturar a imagem, onde foi possível analisar se houve o processo de migração e fazer as devidas comparações de fechamento do risco.

As imagens foram feitas com auxílio de microscópio óptico invertido (LABOMED, modelo TCM 400; Nikon, modelo Diaphot) acoplado à câmera (Laborana, modelo LAB-TCS.w7), e as imagens foram obtidas através do programa IS.Capture (versão 2016) e a análise das imagens foi feita visualmente (análise qualitativa).

A contagem celular de cada tratamento foi realizada para constatar que a mitomicina C de fato inibiu a proliferação celular. Para isso, utilizou-se o ensaio com azul de Trypan, o qual permite a distinção individual das células viáveis das não viáveis, uma vez que este corante é capaz de penetrar em todas as células, porém apenas as células viáveis conseguem bombear o azul de Trypan para fora, diferenciando-se das células mortas, que adquirem coloração azulada.

Análise dos Dados:

A análise das imagens foi feita visualmente (análise qualitativa), e em seguida a largura dos riscos foram medidos nos diferentes tempos de observação. Os dados foram analisados a partir das médias das larguras e dos respectivos erros padrão das médias de

3 experimentos realizados em quadruplicata. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados entre os grupos através do Teste-t, com $p < 0,05$.

4.9 Microscopia Confocal

A microscopia confocal é uma técnica que permite a aquisição de imagens utilizando fluorescência. As imagens geradas por um microscópio confocal possui uma maior resolução e contraste se comparadas às imagens geradas por um microscópio óptico convencional. Uma vez que o microscópio confocal tem a capacidade de excluir a luz emitida por outros pontos que não estão no plano focal. Esse tipo de microscópio possui um conjunto de lentes capaz de focar um cone de luz em uma profundidade predeterminada da célula ou amostra a ser estudada. Quando o ponto focal é alterado, porém se mantém a profundidade, é possível iluminar todo o plano da amostra em estudo, ponto a ponto e, dessa forma, é possível a construção de imagens tridimensionais (SAMWOGERERE & WEEKS, 2005)

O princípio da fluorescência é baseado no uso de compostos químicos denominados fluoróforos. Em geral, os fluoróforos são específicos e utilizados com o intuito de localizar uma área específica da amostra (como núcleo ou actinas, por exemplo). A fluorescência acontece por um fenômeno onde os elétrons do fluoróforo os fótons de energia provindos da fonte do microscópio, que por sua vez capta o fóton emitido pelo elétron ativado e com ele gera uma imagem (METZ, 2004).

Procedimento experimental

Células da linhagem B16-F10 foram plaqueadas na concentração de $2,5 \times 10^4$ /mL em placas circulares com lamínulas acopladas ao fundo, próprias para confocal, e foram incubadas com Piericidina A1 (PA1) na concentração de 500 fM por 72h em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade. O DMSO a 0,4% foi utilizado como controle negativo.

Após as 72h de incubação, o meio foi descartado e as células foram fixadas com formaldeído a 4% por 20 min e em seguida permeabilizadas com Triton X-100 (0,2% em PBS). Após o período de fixação, foram feitas três lavagens com PBS, e as células foram então incubadas com anticorpos específicos para actina (Phalloidin, Alexa-

Fluor® 488) e Hoechst 33342 para a marcação do núcleo. Para serem analisadas no microscópio, as células foram novamente lavadas três vezes com PBS e observadas em PBS.

Análise dos Dados:

A análise dos dados foi feita utilizando a microscopia confocal com comprimentos de onda de excitação e emissão de 488 a 490 nm, respectivamente (ZEISS, modelo LSM 710). A solução de Hoechst 33343 foi utilizada para corar o núcleo das células, com comprimento de onda de excitação e emissão de 350 e 461 nm, respectivamente. Dessa forma foi possível avaliar as características morfológicas das células tratadas com PA1 e compará-las ao controle negativo (não-tratado). O registro das alterações celulares foi feito através de fotografia.

5 RESULTADOS

5.1 Microrganismos Recuperados do Sedimento de Fernando de Noronha

A partir da amostra de sedimento coletada no porto do arquipélago Fernando de Noronha, 16 cepas de microrganismos foram isoladas com base em suas características semelhantes às de actinomicetos, que são muito distintas de outros tipos de bactérias por apresentarem um aspecto opaco, bordas das colônias irregulares e esporulação. Os meios se mostraram igualmente favoráveis para o isolamento dos microrganismos, sendo 5 cepas isoladas no meio TMA, 6 cepas no meio SCA e 5 cepas no meio SWA.

As cepas isoladas foram registradas e depositadas no inventário de bactérias do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia Marinha, e seus extratos brutos obtidos foram testados contra a linhagem HCT-116, em concentrações iniciais de 5 e 50 µg/mL. Os extratos brutos que apresentaram inibição da proliferação celular em pelo menos 75% na menor ou maior concentração, foram considerados ativos, e em seguida foram submetidos a uma análise quantitativa, para a obtenção das respectivas CI_{50} frente a linhagem tumoral HCT-116, expostas por 72h a concentrações seriadas entre 0,003 e 50 µg/mL. Os dados de identificações, atividade citotóxica, meios de isolamento inicial e fenótipos estão apresentadas na **Tabela 4**.

Tabela 4 – Colônias isoladas de bactérias recuperadas de sedimento do arquipélago Fernando de Noronha. Identificação, classificação quanto ao seu fenótipo, atividades citotóxicas dos extratos brutos, e meio de cultura do isolamento inicial. Valores de CI_{50} e $IC_{95\%}$ foram obtidos nas concentrações em µg/mL. (N.T: Não Testadas).

Cepas Isoladas	Meio de cultura inicial	Fenótipo	IC_{50} (µg/mL) (IC 95%)	Processamento
BRA 335	TMA	Actinomiceto	0,32 (0,18 - 0,56)	1°
BRA 336	SCA	Actinomiceto	0,29 (0,04 - 2,5)	1°
BRA 337	SCA	Actinomiceto	0,11 (0,06 - 0,20)	1°
BRA 338	SCA	Actinomiceto	0,47 (0,38 - 0,50)	1°
BRA 348	TMA	Actinomiceto	0,22 (0,14 - 0,35)	1°
BRA 349	TMA	Actinomiceto	10,12 (5,18 - 15,74)	1°

BRA 399	TMA	Actinomiceto	0,06 (0,03 - 0,09)	1°
BRA 540	SWA	Actinomiceto	N.T.	2°
BRA 541	SWA	Actinomiceto	N.T.	2°
BRA 542	TMA	Actinomiceto	N.T.	2°
BRA 560	SWA	Actinomiceto	N.T.	2°
BRA 561	SWA	Actinomiceto	N.T.	2°
BRA 562	SCA	Actinomiceto	N.T.	2°
BRA 563	SWA	Actinomiceto	N.T.	2°
BRA 565	SWA	Actinomiceto	N.T.	2°
BRA 566	SWA	Actinomiceto	N.T.	2°

A partir dos resultados obtidos, foi selecionado o extrato bruto com maior atividade, nesse caso, o da BRA 399 (**Figura 8**) foi escolhida para prosseguir com os experimentos.

Figura 8 – Imagens das colônias da BRA 399 em placa de ágar contendo meio A1. **A)** visão geral da placa; **B)** detalhe das colônias, evidenciando a presença de esporos de coloração branca.

A



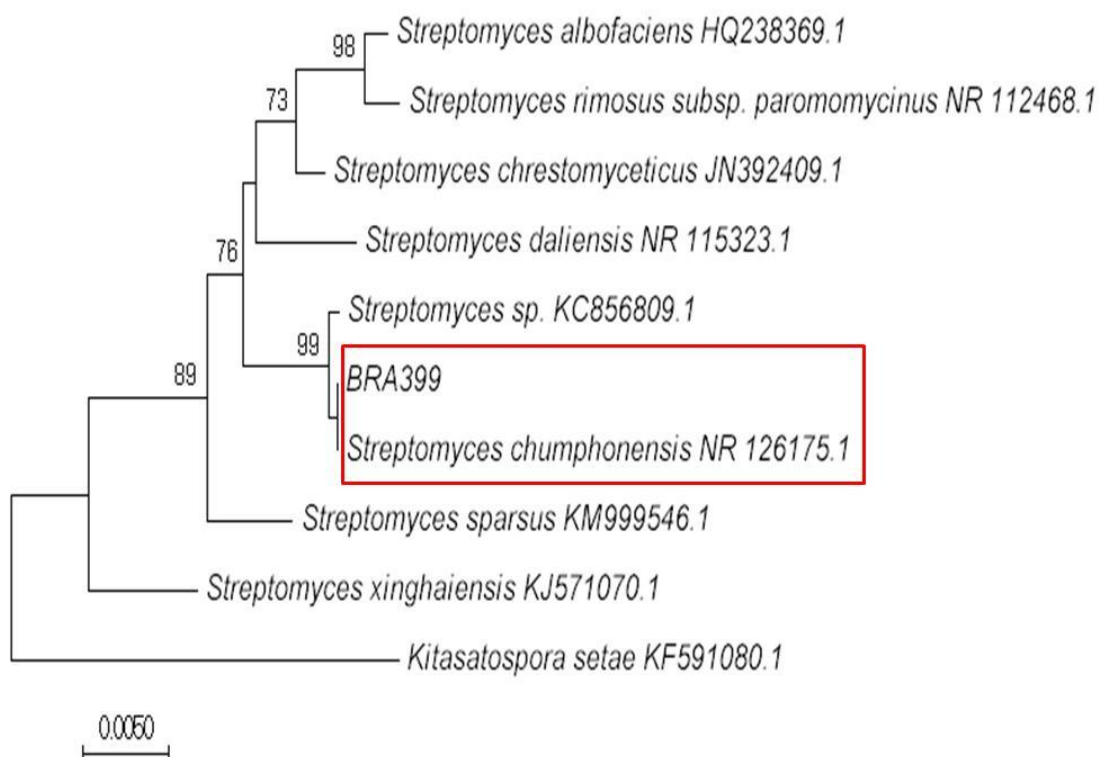
B



5.2 Identificação Molecular da Cepa BRA 399

A cepa BRA 399 foi identificada com um fragmento de 867 pb, com maior similaridade ao grupo de bactérias do gênero *Streptomyces*. A árvore filogenética mostrou um clado formado por [*Streptomyces* sp. + (BRA399 e *Streptomyces chumphonensis*)] com valor de *bootstrap* de 99%. Essa comparação foi realizada com outras já cadastradas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), por meio da ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). (Figura 9).

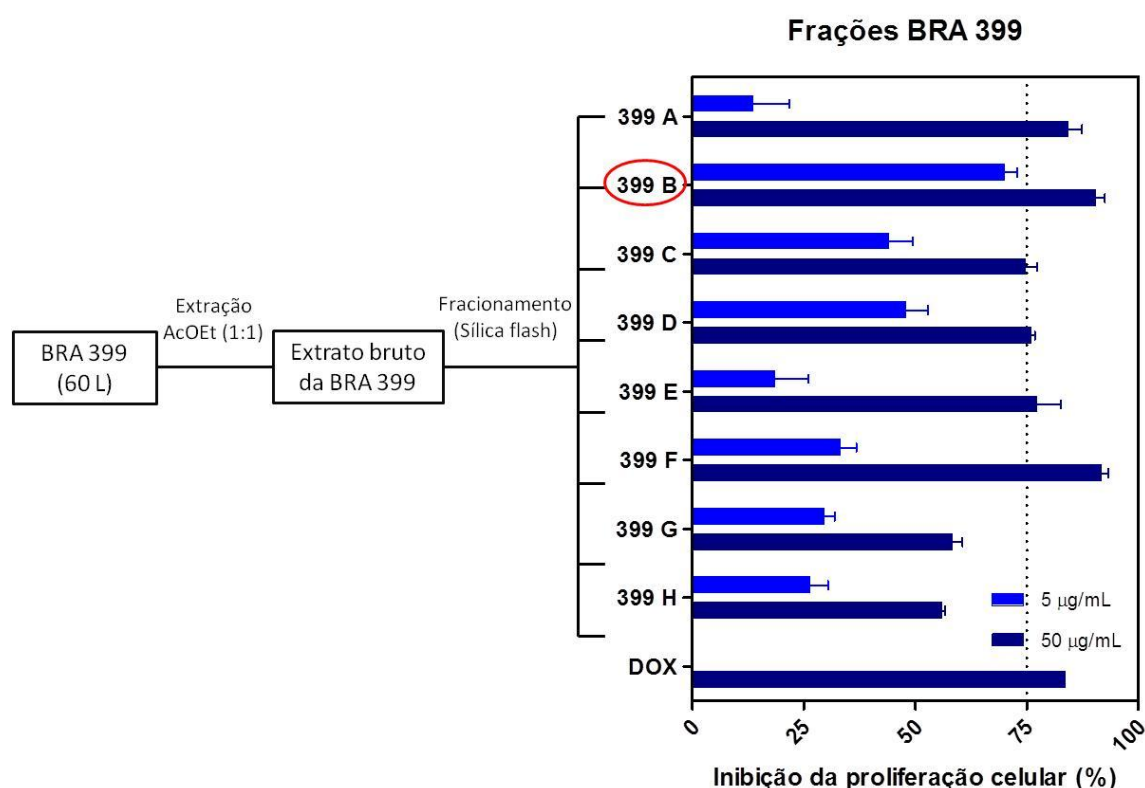
Figura 9 – Análise de *neighbour-joining* baseada em sequências do gene 16S rDNA. Números nos ramos indicam os valores de suporte de *bootstrap* acima de 70%.



5.3 Fracionamento Químico do Extrato da BRA 399 e Desreplicação

As frações do extrato bruto da BRA 399 foram obtidas através de técnicas cromatográficas, e em seguida essas frações foram testadas quanto a sua atividade citotóxica, e para isso, foram usadas duas concentrações iniciais de 5 e 50 µg/mL, como mostrado na Figura 10.

Figura 10 – Fluxograma esquemático da obtenção das frações da BRA 399 e suas respectivas inibições de crescimento em células HCT-116 pelo ensaio do MTT, 72h.



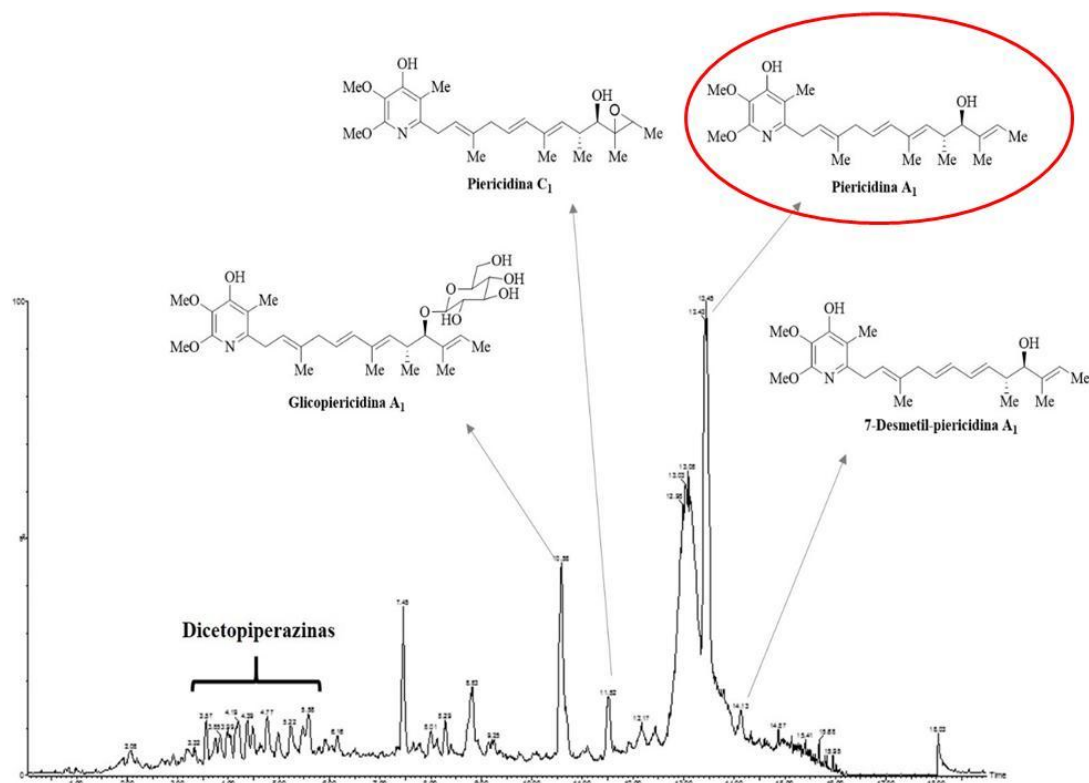
Os dados correspondem a média \pm erro padrão da média de 3 experimentos em duplicata. As barras em azul claro representam a inibição de proliferação na menor concentração (5 $\mu\text{g/mL}$), nas barras em azul escuro representam a inibição de proliferação na maior concentração testada (50 $\mu\text{g/mL}$). Amostras que inibiram mais que 75% da proliferação celular foram consideradas ativas.

Após a análise citotóxica das frações obtidas, seguiu-se com a espectrometria de massa para obtenção das massas moleculares presentes nas frações testadas. Devido a uma ampla quantidade de compostos químicos presentes em todas as frações, foi inviável isolar todos os compostos presentes em todas as frações. Porém, como a fração B mostrou ser mais ativa, tanto na menor quanto maior concentração, esforços foram feitos para tentar identificar os principais compostos presentes na mesma.

A fração B foi então analisada por Cromatografia Líquida de alta eficiência acoplada a um Espectrômetro de Massas (LC/MS) e as massas encontradas foram comparadas ao banco de dados para massas de produtos naturais marinhos: *AntiMarin*. A desreplicação da fração B mostrou picos com massas condizentes com compostos pertencentes à classe das piericidinas, sendo possível identificar a Piericidina A,

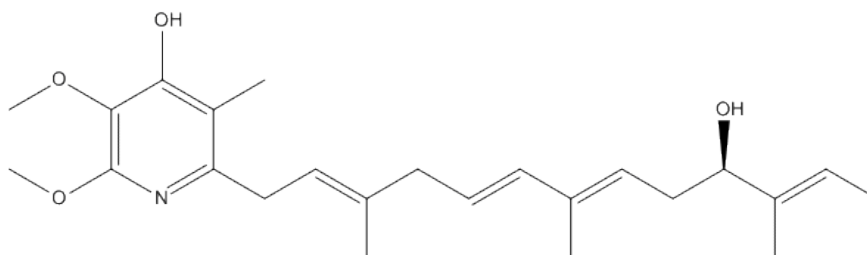
Piericidina C, 7-Desmetil-piericidina A, Glicopiericidina A, bem como classe de Diketopiperazinas, representadas na **Figura 11**.

Figura 11 – Desrepliação da fração B do extrato bruto da BRA-399.



Dentre os compostos encontrados na fração B, optou-se por isolar o que estava presente em maior quantidade para que pudesse ser dada continuidade aos experimentos. Sendo assim, foi realizado o isolamento do composto majoritário com conhecida atividade citotóxica, a Piericidina A1 (PA1) (**Figura 12**).

Figura 12 – Estrutura química do composto “PA1”, identificado como Piericidina A1 ($C_{25}H_{37}NO_4$) isolado de *Streptomyces sp.*



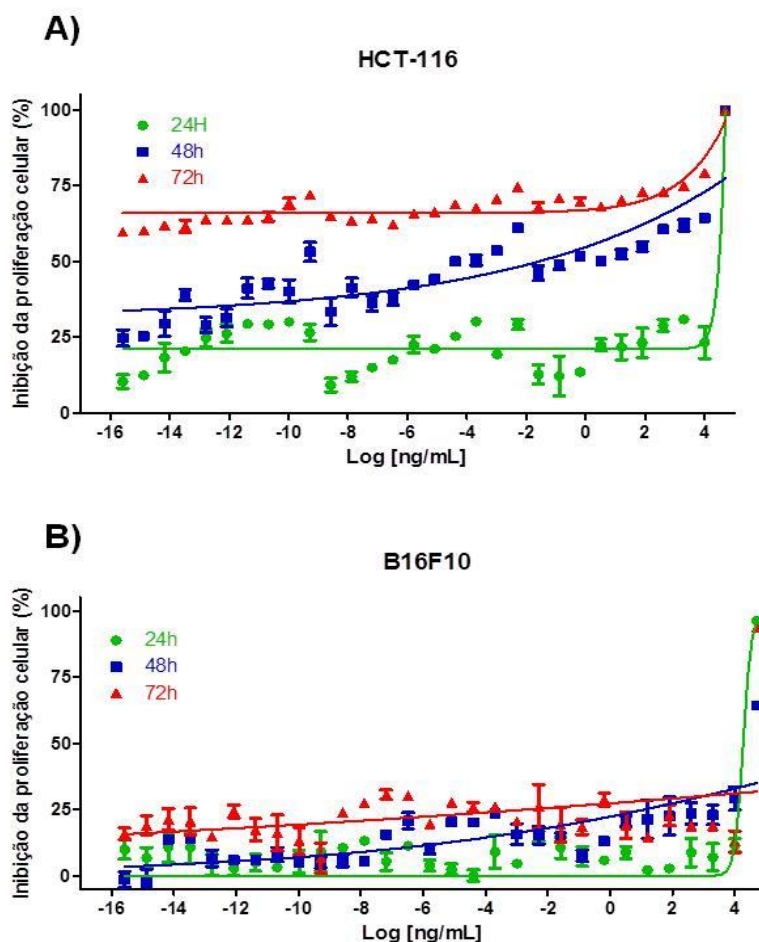
Fonte: YOSHIDA, SHIRAIISHI e TAKAHASHI, 1977)

5.4 Curvas de Concentração-efeito

5.4.1 Ensaio do MTT

Na **Figura 13**, estão apresentadas as curvas de concentração-efeito da Piericidina A1 nas duas linhagens testadas, evidenciando perfis de bioatividade distintos de atividade para as duas linhagens testadas: HCT- 116 (**A**) e B16-F10 (**B**). Pode-se observar que em HCT-116 a atividade da PA1 foi tempo dependente, causando mais inibição no maior tempo (72h), onde a inibição da proliferação celular chegou a mais de 60% e houve uma menor inibição no menor tempo (24h). Em B16-F10 a atividade de PA1 foi tempo dependente, porém houve uma menor diferença de inibição entre o maior e menor tempo, se comparado a HCT-116. Os gráficos plotados através dos dados de absorbância obtidos dos testes realizados não nos permitiram obter a concentração inibitória média, pois o padrão de curvas das PA1 não é uma sigmóide.

Figura 13 – Curvas concentração-efeito de Piericidina A1 isolada de *Streptomyces sp* sobre as linhagens celulares HCT-116 e B16-F10 avaliadas pelo ensaio do MTT após 24, 48 e 72 horas de incubação.

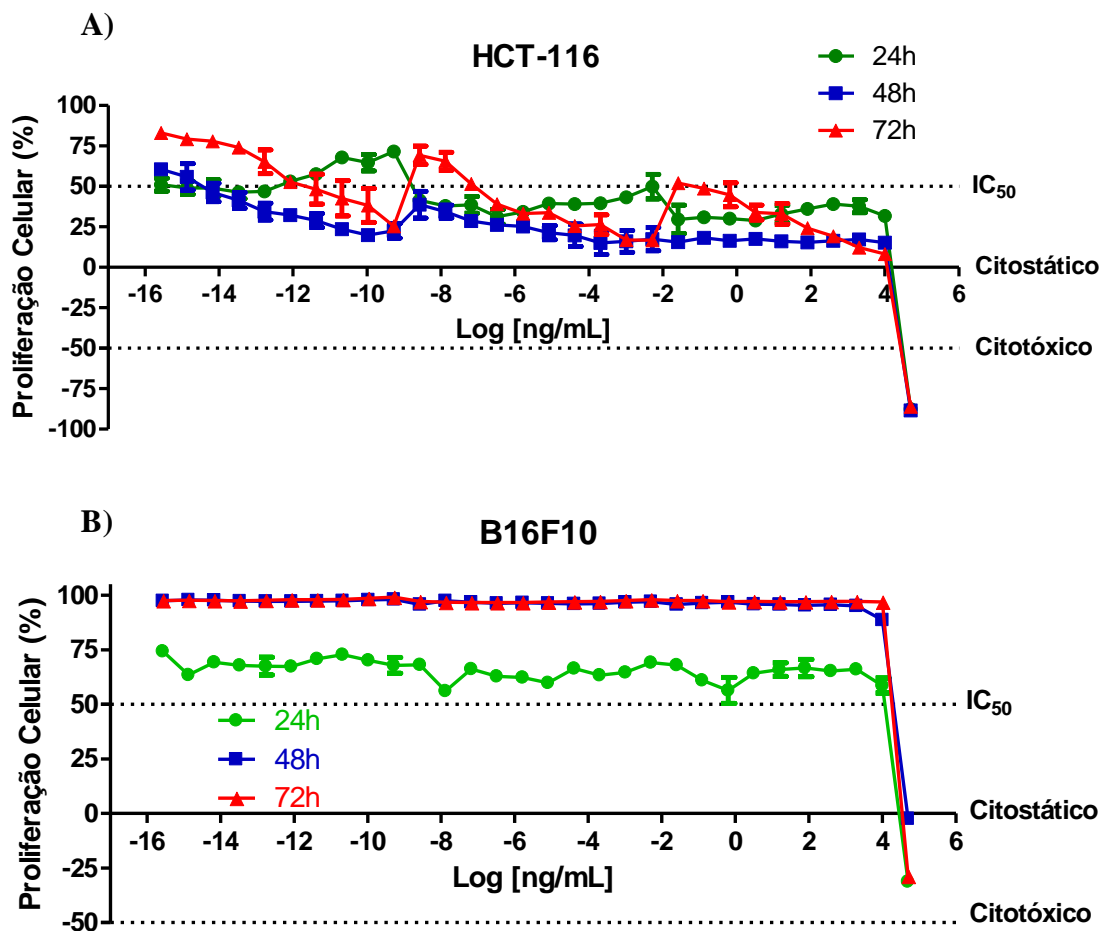


As curvas de concentração da PA1 não apresentam o padrão sigmóide padrão. Em verde: curva do tempo de 24h de incubação com PA1, em azul: curva de tempo de 48h de incubação com PA1 e em vermelho: curva do tempo de 72h de incubação com PA1. Os dados estão apresentados como os valores da média \pm erro padrão da média (E.P.M) obtidos de três experimentos independentes realizados em duplicata.

5.4.2 Ensaio do SRB

Na **Figura 14** a frente, estão apresentadas curvas de concentração-efeito de Piericidina A1 nas duas linhagens testadas, evidenciando perfis de bioatividade distintos. Pode-se observar que tanto em HCT-116 quanto em B16-F10, que somente a concentração mais alta, referente a 50.000 ng/mL (= 120 μ M) foi citotóxica, as demais concentrações mostraram uma atividade citostática sobre as células testadas.

Figura 14 – Curvas concentração-efeito de Piericidina A1 isolada de *Streptomyces sp* sobre as linhagens celulares HCT-116 e B16-F10 avaliadas pelo ensaio do SRB após 24, 48 e 72 horas de incubação.

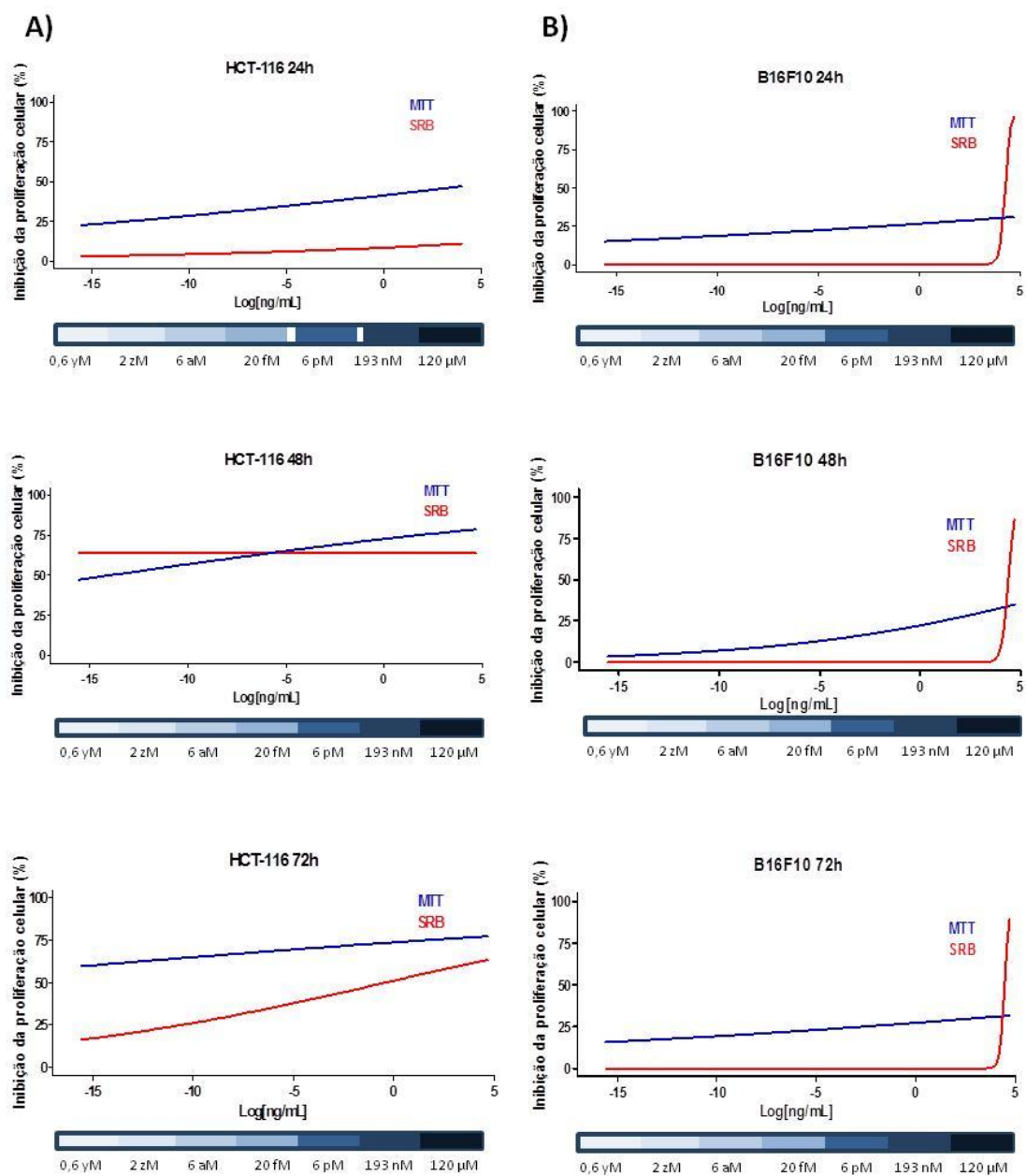


Em **A)** gráfico representativos das células HCT-116 e em **B)** gráficos representativos das células B16-F10. Observando o eixo y - acima de zero: efeito citostático, abaixo de zero: efeito citotóxico. As linhas

na cor verde indicam o tratamento de 24h com PA1, linhas azuis indicam tempo de tratamento de 48h com PA1 e em linhas em vermelho indicam tratamento de 72h com PA1. Os dados estão apresentados como os valores da média \pm erro padrão da média (E.P.M) obtidos de três experimentos independentes realizados em duplicata.

A **Figura 15** a seguir compara os dois testes colorimétricos realizados para a avaliação da citotoxicidade: MTT e SRB. A partir da comparação dos resultados obtidos, pode-se observar diferentes padrões de atividade para as linhagens testadas: HCT- 116 e B16-F10 pelos dois testes colorimétricos realizados. Em todos os três tempos de incubação das células com PA1, nas duas linhagens testadas, o MTT superestimou a atividade inibitória da PA1 quando comparamos com SRB. Esse dado nos chama a atenção para o cuidado em buscar novos métodos de análises que sejam mais confiáveis, nesse sentido, podemos observar que o SRB, por ser um método que independe do metabolismo celular, é um método mais confiável se comparado com o MTT.

Figura 15 – Comparação entre os dois métodos colorimétricos utilizados para a avaliação da citotoxicidade: MTT e SRB.



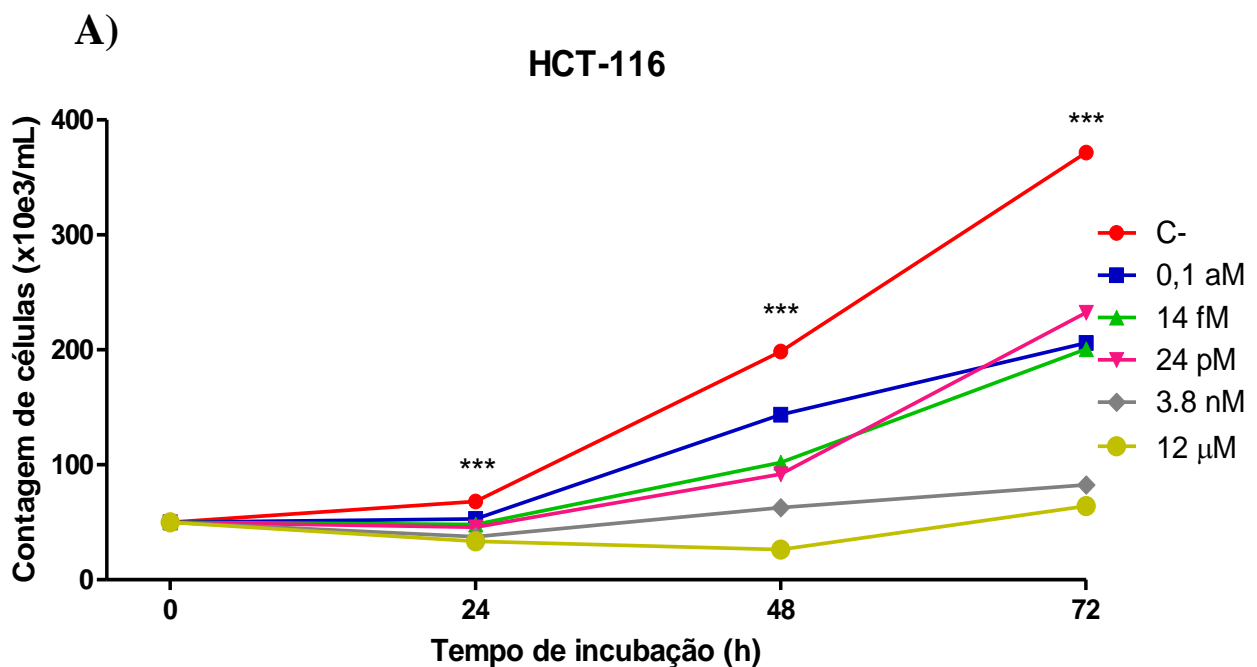
Observa-se diferentes padrões de atividade para as linhagens testadas. Coluna A: HCT-116 e na coluna B: B16-F10. Linha em vermelho representando a curva obtida através do teste de SRB e linha em azul representando a curva obtida através do teste do MTT. As barras com degradê de azul localizadas abaixo de cada gráfico, indicam as concentrações de PA1 testadas no gráficos. Cor azul escuro representando a maior concentração ($120 \mu\text{M} = 50000 \text{ ng/mL}$) até chegar a menor concentração ($0,6 \text{ yM} = 2,6 \times 10^{-6} \text{ ng/mL}$), representada em azul claro.

5.5 Viabilidade e Número de Células por Citometria de Fluxo

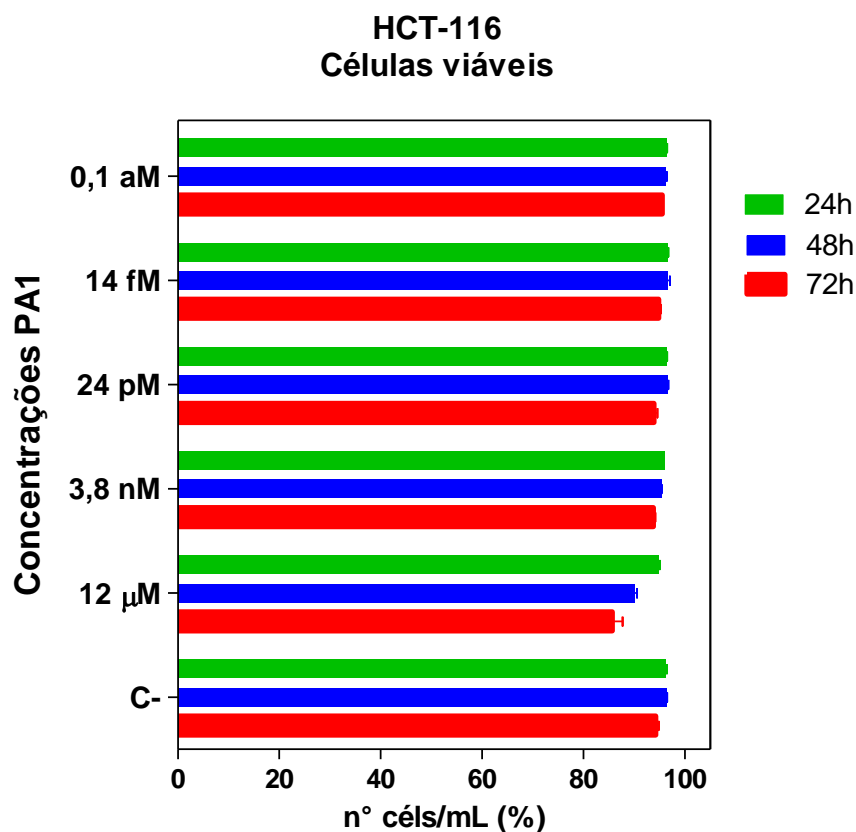
5.5.1 Análise em células HCT-116

A avaliação do número e da viabilidade das células HCT-116 incubadas com PA1 foi determinada através de citometria de fluxo. Os tratamentos variando de 12 μM a 0,1 aM de PA1 afetou a concentração de células de modo concentração-dependente nas maiores concentrações (3,8 nM e 12 μM), porém pode-se notar que a viabilidade celular nessas concentrações não foi alterada, como mostrado na **Figura 16 (A)**. Adicionalmente, a PA1 não alterou a integridade de membrana das células durante os tempos de 24 e 48 horas, e a alteração em 72h foi muito discreta, tendo o número de células viáveis permanecido semelhante ao controle negativo, como demonstrado na **Figura 16 (B)**. As diferenças de concentração de células tratadas com PA1 comparadas ao controle negativo, foram significativas em todos os tempos testados e em todas as concentrações.

Figura 16 – Concentração de células HCT-116 (A) e viabilidade celular designada pela integridade de membrana plasmática (B), por citometria de fluxo, após 24, 48 e 72h de exposição em concentrações de PA1 variando de 3,8 nM e 12 μM .



B)



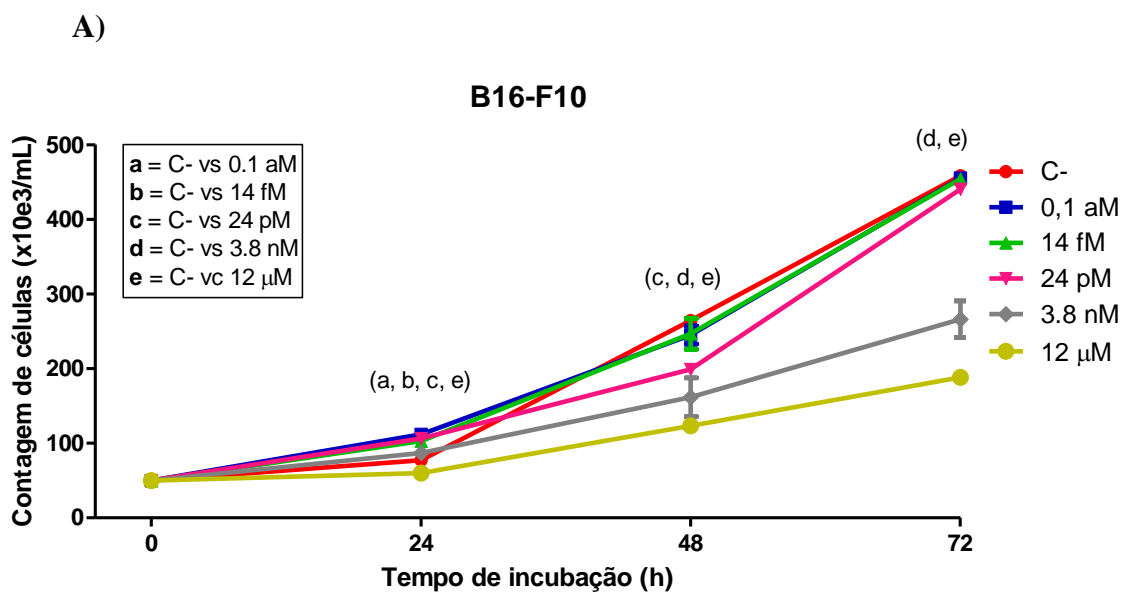
Para o experimento o controle negativo foi tratado com o mesmo veículo utilizado para diluição da amostra (DMSO 0,4%). Análise por two-way ANOVA seguido por teste de Dunnet (GraphPad Prism versão 5.1). Os dados estão apresentados como os valores da média \pm erro padrão da média (E.P.M) obtidos de dois experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$

5.5.2 Análise em células B16-F10

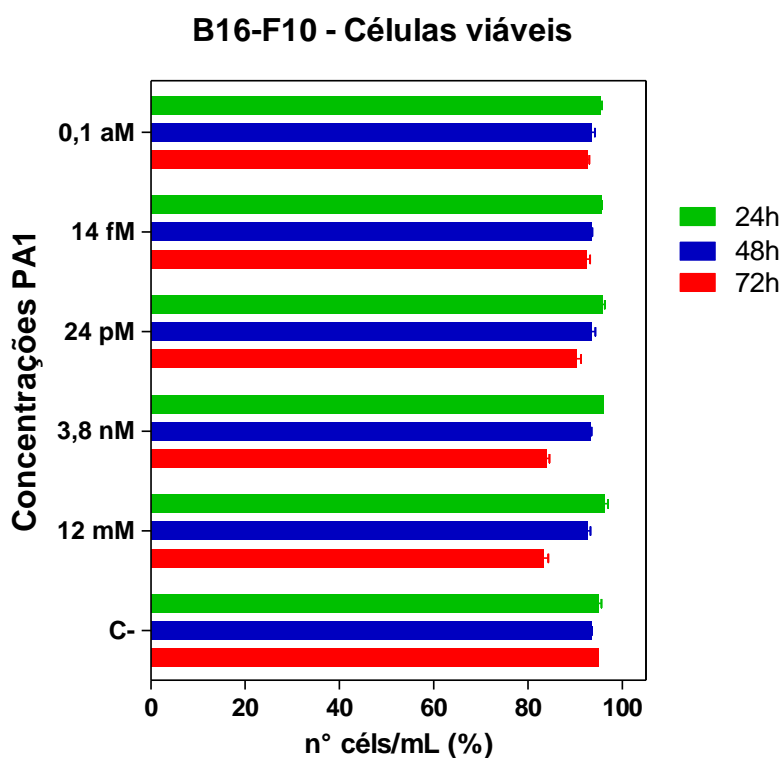
A avaliação do número e da viabilidade das células B16-F10 incubada com PA1 foi igualmente determinada através de citometria de fluxo. Os tratamentos variando de 3,8 nM e 12 μ M de PA1 também afetaram a concentração de células de modo concentração-dependente nas maiores concentrações (3,8 nM e 12 μ M), quando houve redução na contagem total de células, principalmente no tempo de 72 horas, como mostrado na **Figura 17 (A)**. A PA1 não alterou a integridade de membrana das células durante os tempos de 24 e 48 horas, havendo uma discreta inibição nas duas concentrações mais altas no tempo de 72h, tendo o número de células viáveis permanecido semelhante ao controle negativo, como demonstrado na **Figura 17 (B)**. As

diferenças de concentração de células tratadas com PA1 comparadas ao controle negativo, que foram significativas, estão demonstradas no gráfico A.

Figura 17 – Concentração de células B16-F10 (A) e viabilidade celular designada pela integridade de membrana plasmática (B), por citometria de fluxo, após 24, 48 e 72h de exposição em concentrações de PA1 variando de 3,8 nM e 12 μ M.



B)



O controle negativo (C-) recebeu apenas o veículo de diluição da substância (DMSO 0,4%). Os dados apresentados correspondem à média \pm E.P.M. de 2 experimentos independentes, realizados em triplicata, com 10.000 eventos adquiridos por replicata.

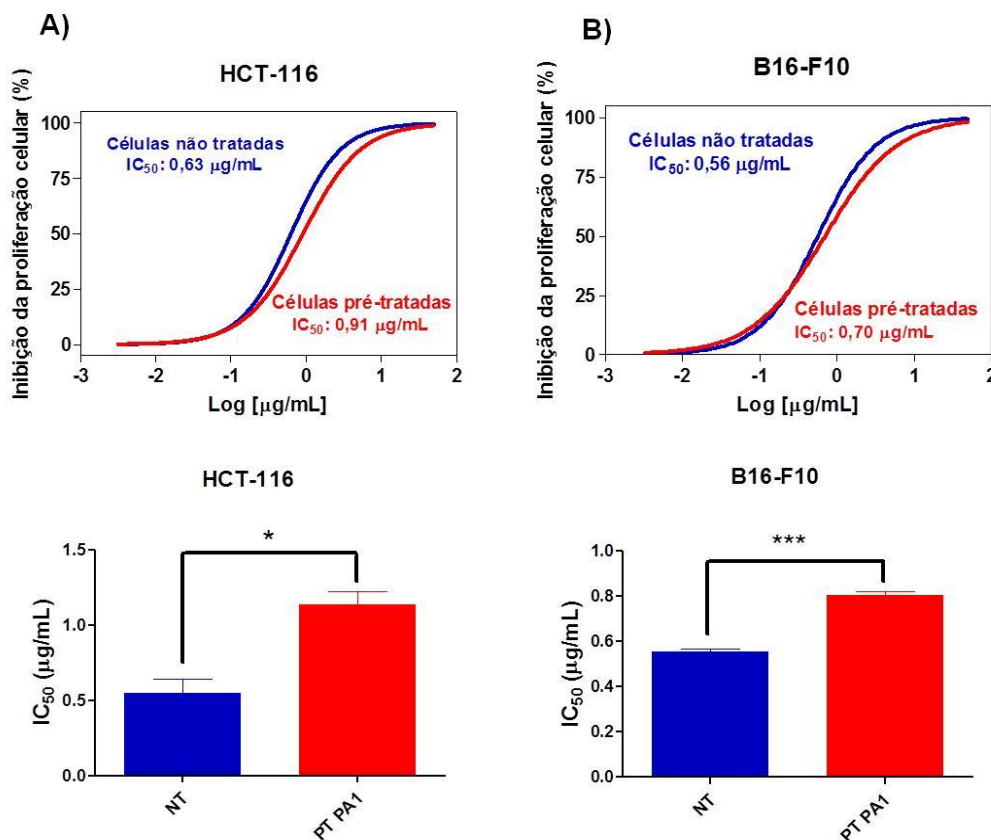
Análise por two-way ANOVA seguido por teste de Dunnet (GraphPad Prism versão 5.1). Os dados estão apresentados como os valores da média \pm erro padrão da média (E.P.M) obtidos de três experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0.05$.

5.6 Teste de Sensibilidade a Quimioterápico

Após a realização dos testes de viabilidade e contagem celular, a concentração de 500fM foi escolhida para dar continuidade aos testes de Associação a quimioterápico, migração e microscopia confocal, pois essa concentração ainda não foi considerada tóxica e é a concentração intermediária dos testes anteriores, que ainda poderia então ter atividade sobre as células tumorais sem causar morte celular.

Neste ensaio, observou-se que a Piericidina A1 (PA1) na concentração de 500 fM quando em contato com as células por 72h foi capaz de induzir um discreto aumento no valor da concentração inibitória em ambas linhagens celulares testadas. Pode-se observar na **Figura 18** a seguir que as células pré-incubadas com PA1, e que foram posteriormente tratadas com o quimioterápico Doxorrubicina, possuem uma inibição da proliferação celular menor quando comparadas às células não tratadas previamente com PA1. A linhagem celular HCT-116 pré-incubada com PA1 obtiveram CI_{50} de 0,91 $\mu\text{g/mL}$, enquanto que as células que não tiveram a pré-incubação obtiveram IC_{50} de 0,63 $\mu\text{g/mL}$. Já as células B16-F10 pré-tratadas com PA1 obtiveram CI_{50} de 0,70 $\mu\text{g/mL}$, enquanto que as células que não tiveram o pré-tratamento obtiveram IC_{50} de 0,56 $\mu\text{g/mL}$. Isso mostra que mesmos em baixas concentrações, a PA1 interfere no metabolismo celular de forma a tornar as células menos susceptíveis ao quimioterápico testado. A diferença das concentrações inibitórias entre as células previamente tratadas com PA1 e as não tratadas com PA1 foram significativas.

Figura 18 – Curvas concentração-efeito da Doxorrubicina sobre as linhagens celulares HCT-116 (coluna A) e B16-F10 (coluna B), pré-tratadas e não-tratadas com PA1, evidenciando um aumento significativo na resistência das células pré-tratadas com PA1. Avaliação feita pelo ensaio do SRB após 72 horas de incubação.



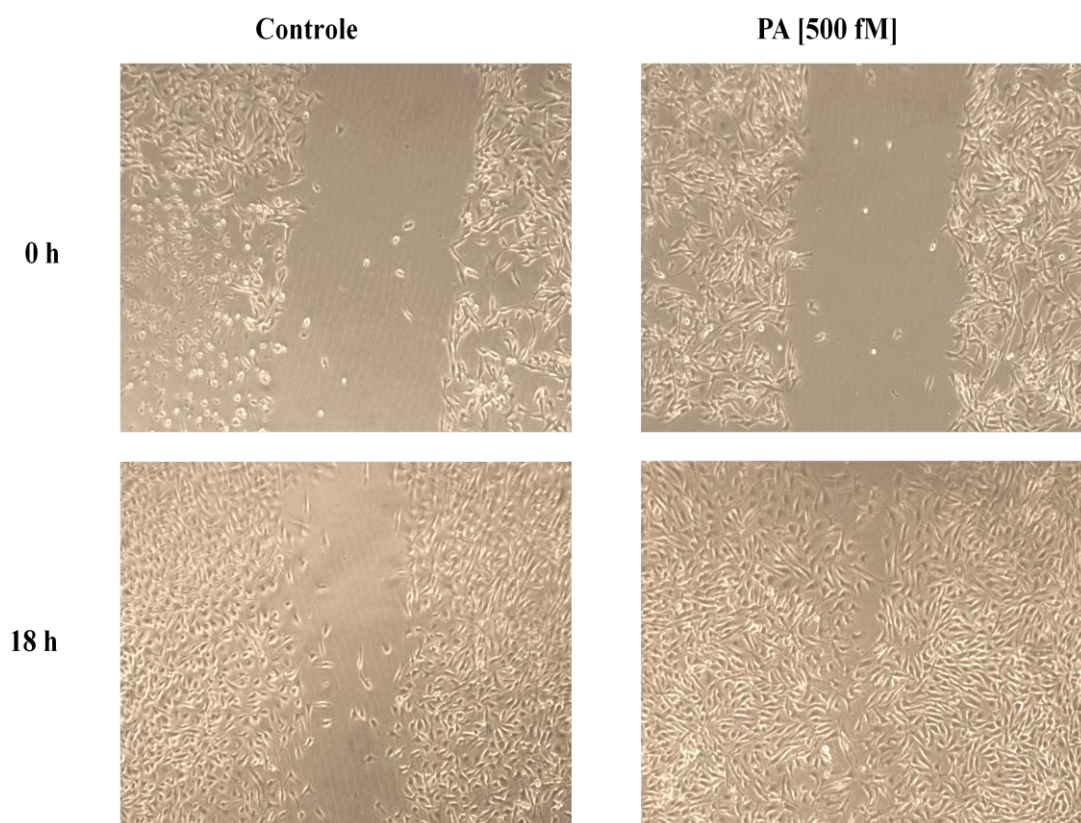
Nos gráficos de barras, estão apresentadas as concentrações inibitórias médias de 50% da proliferação celular, após 72h de tratamento com Doxorrubicina. NT em azul: células não pré-incubadas com PA1, PT PA1 em vermelho: células que foram pré-tratadas com PA1 a 500fM. Os dados apresentados correspondem à média \pm E.P.M. de 2 experimentos independentes, realizados em triplicata. * $p < 0,05$ comparado ao controle por Teste-t.

5.7 Ensaio de Migração Celular por Cicatrização *in vitro* (Wound Healing)

Observando que a PA1 possui atividade mesmos em baixas concentrações e visto que através do testes de associação podemos inferir que o metabolismo da célula estava sendo alterado, procurou-se saber se a PA1 possui atividade sobre as fatores que poderiam estar relacionados à diminuição da sensibilidade celular ao quimioterápico, como migração celular. Sendo assim, foi realizado o ensaio de migração celular por cicatrização utilizando a linhagem de melanoma metastático B16-F10. Neste ensaio,

observou-se que a PA1 aumentou a motilidade celular na concentração testada (500 fM) durante o período de incubação. O tempo de 18h foi o escolhido para a fotografia, pois foi o intervalo em que as células incubadas com PA1 praticamente chegaram à confluência total. Com esse teste, pode-se observar que as células tratadas com PA1 a 500 fM fecharam o risco num intervalo de tempo menor do que o controle, como mostrado na **Figura 19**.

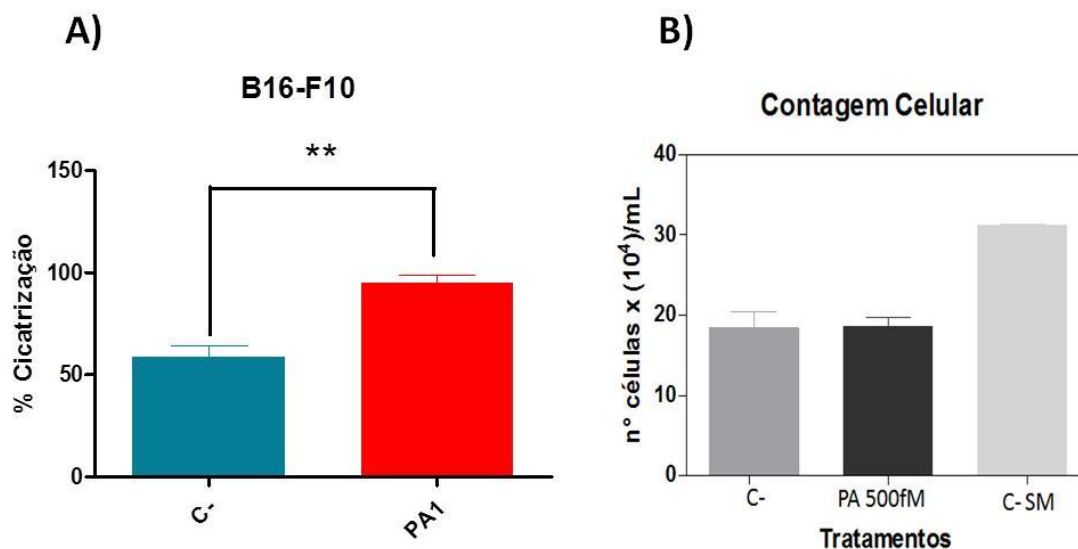
Figura 19 – Fotomicrografia de campos celulares representativos do ensaio de migração celular em células B16-F10 (melanoma murino) em 0 e 18h.



Controle (DMSO) e PA1 (Piericidina A1 a 500 fM). Aumento 40X. Ensaio qualitativo. Resultado representativo de três experimento realizados em quadruplicata.

A partir da análise estatística pode-se observar que as células pré-tratadas com PA1 por 18h induziram um fechamento mais acelerado do risco, como apresentado na **Figura 20 (A)**. As análises de contagem celular, como mostrado na **Figura 20 (B)**, mostraram que a mitomicina C foi capaz de inibir a proliferação celular, o que sugere que o fechamento dos riscos ocorreu por migração e não por proliferação celular.

Figura 20 – Contagem celular comprovando o efeito antiproliferativo da mitomicina C sobre as células B16-F10.



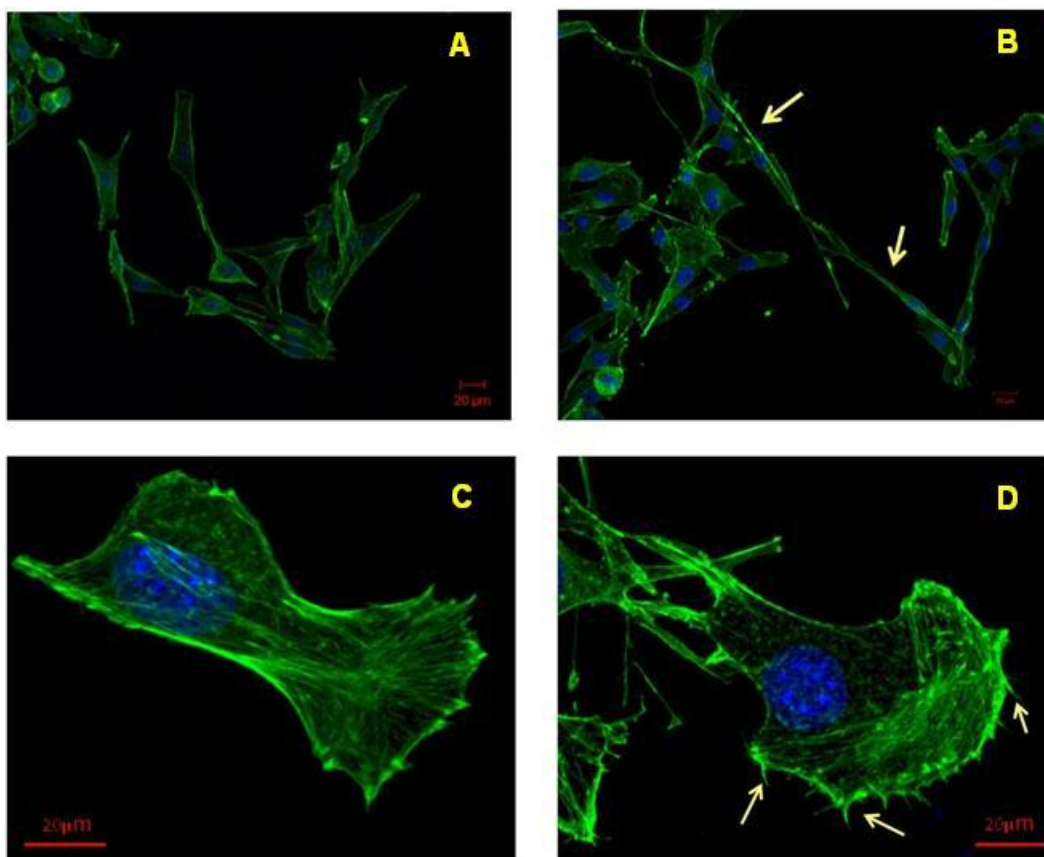
Resultado de três experimentos realizados em quadruplicata No gráfico **A** é apresentando a porcentagem de cicatrização do risco, onde 0 % representa ausência de migração e 100% representa fechamento total do risco. C- em azul: representando as células não pré-tratadas com PA1. Neste caso, as células somente receberam o mesmo veículo utilizado para diluição da amostra (DMSO 0,4%), e PA1 em vermelho representando as células pré-tratadas por 18h com PA1. No gráfico **B**: C- representam células não pré-tratadas com PA1 que receberam mitomicina C e PA1 500fM células que foram pré-tratadas com PA1 e receberam mitomicina C, C- SM representam células não pré-tratadas com PA1 e que não receberam mitomicina C. Visto no tempo de 18h. C- (Controle negativo, DMSO), PA1 500fM (concentração de PA1 a 500 fM) e C- SM (Controle negativo, DMSO, sem mitomicina C). Os dados estão apresentados como os valores da média \pm erro padrão da média (E.P.M) obtidos de três experimentos independentes realizados em quadruplicata. Teste-t. ** $p < 0,05$.

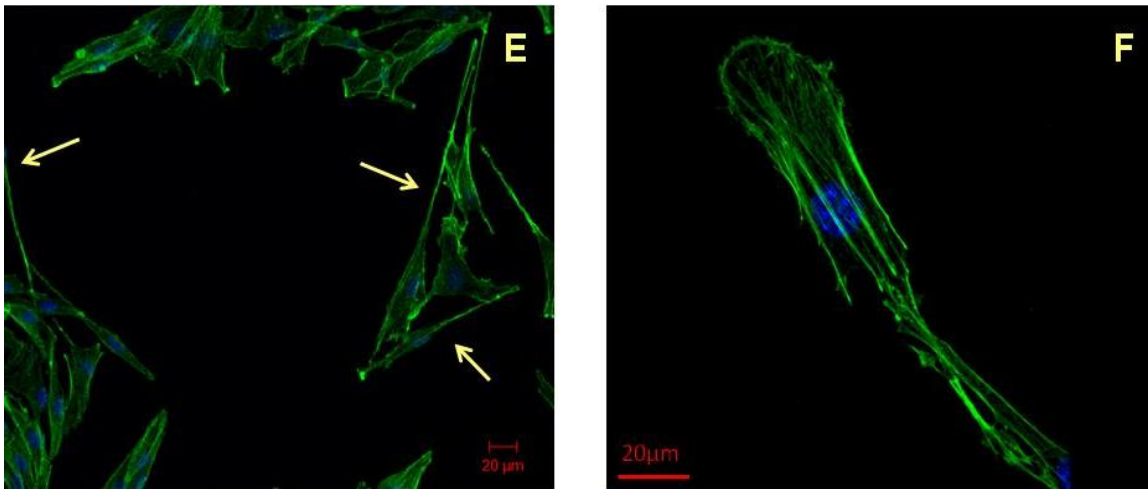
5.8 Análise das células B16-F10 por Microscopia Confocal

Após analisar os testes anteriores e verificar que de fato a PA1 poderia estar alterando o metabolismo celular, deixando-as com comportamento similar a células mais agressivas, procurou-se entender melhor o efeito da Piericidina A1 frente a morfologia celular. As células B16-F10 foram coradas com faloidina conjugada com Alexa-Fluor 488 (cor verde) utilizando microscopia confocal. Neste ensaio observamos que, no controle (DMSO 0,4%), **Figura 21** (A e C), as células apresentaram morfologia

típica da linhagem B16-F10, com forma semelhante à célula epitelial e células também alongadas. Há também uma organização homogênea dos filamentos de actina por todo o citoplasma. Após tratamento com a PA1 por 72 horas, observamos um alongamento celular mais evidente, com organização dos filamentos de actina dispostos ao longo do comprimento da célula, como melhor evidenciado na **Figura 21** (B e D). Nessas células tratadas com PA1 também foi possível observar a presença de estruturas formadas por actina na periferia das células, com aparência semelhante a filopódios, como evidenciado por setas na **Figura 21** (D), diferente do que foi encontrado no controle negativo. Na **Figura 21** (E e F) evidenciam a forma alongada da célula tratada com PA1 500fM, mostrando uma distribuição diferenciada dos filamentos de actina, o que não ocorre no controle negativo. Os núcleos das células, marcados com Hoechst 33342 (cor azul), aparentemente não possuem diferenças entre o controle e o tratado.

Figura 21: Avaliação de alteração do fenótipo celular em células B16-F10 por microscopia confocal.





As células (B16-F10) foram expostas à Piericidina A1 durante 72h. Após o período de incubação, os filamentos de actina foram corados por Faloidina. **A** e **C**: controle (DMSO a 0,4%); **B**, **D**, **E** e **F**: tratamentos com PA1 500 fM. Setas amarelas evidenciam a disposição dos filamentos de actina e a forma mais fusiforme das células tratadas. As barras em vermelho possuem o comprimento de 20 μm .

6 DISCUSSÃO

O presente estudo foi desenvolvido a partir da triagem para compostos bioativos, visando a busca por novos compostos com potencial biotecnológico que pudessem auxiliar em estudos relacionados ao câncer. Para isso foram utilizados extratos de actinomicetos isolados de sedimentos coletados no arquipélago de Fernando de Noronha, pertencente ao estado de Pernambuco. Estudos com esse enfoque nunca foram descritos no arquipélago de Fernando de Noronha.

O sedimento marinho foi escolhido para o presente estudo, pois tem sido documentado como uma excelente fonte de actinomicetos (BECERRIL-ESPINOSA *et al.*, 2013; DAS, LYLA & AJMAL KHAN, 2008; GONTANG, FENICAL & JENSEN, 2007; JENSEN *et al.*, 2005; ÖZCAN *et al.*, 2013; VICENTE *et al.*, 2013).

As 16 cepas bacterianas isoladas neste trabalho apresentaram características morfológicas/fenotípicas de actinomicetos, a saber: são bactérias que possuem colônias com organização filamentosa, muitas vezes ramificada, com coloração opaca devido à produção de esporos. O isolamento de actinomicetos é normalmente feito através da aplicação de fatores seletivos adequados durante o processo de pré-tratamento das amostras, sejam estes sedimentos, invertebrados ou água do mar. O objetivo desses fatores seletivos é reduzir a incidência de bactérias de crescimento rápido e preservar a viabilidade das placas com culturas puras de actinomicetos (SUBRAMANI & AALBERSBERG, 2013). Para isso, três tipos de meio de cultura seletivos diferentes preparados em água do mar foram utilizados nesta etapa inicial, afim de recuperar um maior número de actinomicetos. No presente trabalho, os actinomicetos foram recuperados em quantidades similares entre os três meios seletivos utilizados, sendo o SCA (amido-caseína) o mais enriquecido entre eles. Os meios TMA (minerais traços) e SWA (água do mar), mais pobres, também contribuíram de forma semelhante quanto ao número de actinomicetos recuperados. Esses últimos possuem concentrações relativamente baixas de nutrientes, que, em geral, favorecem o isolamento de actinomicetos, além de contribuírem reduzindo o crescimento de outros tipos de bactérias menos resistentes ao estresse nutricional (HAMEŞ-KOCABAŞ & UZEL, 2012; JENSEN *et al.*, 2005) e não desejáveis para esse estudo.

Em sua maioria, os actinomicetos são formadores de esporos aéreos bastante resistentes, por exemplo, ao calor e ao ressecamento (SUBRAMANI & AALBERSBERG, 2013; XIONG *et al.*, 2013), para isso, foi utilizado o método de

aquecimento como forma de reduzir o aparecimento de outras bactérias que fugiam ao interesse deste trabalho.

Os extratos brutos obtidos dos actinomicetos isolados do arquipélago Fernando de Noronha e testados em células de câncer colorretal, apresentaram concentrações inibitórias médias (CI_{50}) que variaram de 0,06 a 10,12 $\mu\text{g/mL}$. A bactéria BRA 399 destacou-se dentre as demais por apresentar a menor CI_{50} (0,06 $\mu\text{g/mL}$) e foi escolhida para prosseguir os estudos de isolamento do princípio ativo e identificação da bactéria. A BRA 399 foi identificada a partir do sequenciamento e análise comparativa do gene do rDNA 16S como sendo um actinomiceto pertencente ao gênero *Streptomyces*.

Bactérias desse gênero são abundantes tanto em ambiente terrestre quanto no ambiente aquático dulcícola e marinho (WAKSMAN & HENRICE, 1943). Em 1943 também foi descoberto o primeiro agente específico efetivo no tratamento da tuberculose, a estreptomicina, derivada do actinomiceto *Streptomyces griseus*. Desde então, outros compostos com atividade antibiótica produzidos por espécies do mesmo gênero foram descobertos, e são importantes até os dias de hoje, como é o caso do cloranfenicol, a vancomicina, tetraciclina, e macrolídeos, demonstrando a relevante capacidade biossintética deste grupo de bactérias (JENSEN *et al.*, 2005; ROMANO, PROF & OSAMU, 2009).

Até agora, mais de 10.000 compostos ativos foram isolados de actinomicetos, dos quais, cerca de 7.500 são derivados de *Streptomyces* e 2.500 são pertencentes às chamadas espécies raras de actinomicetos. Em revisão feita por MANIVASAGAN *et al.* em 2013, dos 71 novos metabólitos secundários produzidos por actinomicetos marinhos, 46 foram isolados a partir de estreptomicetos.

A árvore filogenética obtida a partir do sequenciamento do rDNA da BRA 399 mostrou fortes indícios de que essa bactéria poderia ser identificada como *Streptomyces chumphonensis*. Esta espécie de actinomiceto foi descoberta recentemente, sendo descrita pela primeira vez por PHONGSOPITANUN *et al.* em 2014. A cepa *S. chumphonensis* foi recuperada também de sedimento marinho na província de Chumphon, localizado ao sul da Tailândia. Estudos complementares serão necessários para confirmação que a BRA 399 é de fato essa nova bactéria. Se confirmado, será o primeiro registro dessa bactéria fora da Tailândia. Além disso, estudos sobre suas atividades biológicas também não foram descritos.

O fracionamento bioguiado da BRA-399 juntamente com técnicas cromatográficas proporcionaram a escolha da fração mais ativa e, em seguida, a

identificação dos compostos presentes nessa fração: Piericidina A1, Piericidina C, 7-Desmetil-piericidina A1, Glicopiericidina A, bem como a classe de Diketopiperazinas.

Optou-se por seguir os estudos neste trabalho com Piericidina A1 por se tratar de um composto puro com rendimento relativamente alto e facilidade na obtenção. Esta substância teve o seu primeiro isolamento reportado em 1965 por TAKAHASHI, porém o trabalho de revisão da sua estrutura estereoquímica, feito por YOSHIDA, SHIRAISHI e TAKAHASHI em 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 A1 foi designada como um potente inseticida, e isolada da espécie *Streptomyces mobaraensis*.

As Piericidinas são moléculas produzidas exclusivamente por actinomicetos, quase que exclusivamente do gênero das *Streptomyces* (ZHOU, FENICAL, 2016). Muitos estudos mostraram o isolamento de diversas formas de piericidinas, produzidas por outras espécies de *Streptomyces* (YOSHIDA, SHIRAISHI & TAKAHASHI, 1977). Diversos estudos realizados com a Piericidina A1, enfatizaram suas concentrações inibitórias relatando sua atividade na ordem de nanomolar. Os estudos foram realizados em diferentes linhagens, tais como células do tecido ovariano do inseto (YOSHIDA *et al.*, 1979), ; células leucêmicas de ratos (SCHNERMANN *et al.*, 2006), células de câncer de cólon murino (HWANG *et al.*, 2008), fibroblastos de camundongos (SURUP *et al.*, 2008); carcinoma pancreático (MOMOSE *et al.*, 2010, SINGH *et al.*, 2013).

Em 2014, Sahn e colaboradores relataram a potente atividade da PA1 em diferentes linhagens tumorais, mostrando inibição celular na ordem de grandeza de nanomolar. Porém estudos mais aprofundados mostrando alterações de fenótipo em células tumorais induzidos pela PA1 não haviam sido realizados.

As piericidinas apresentam um núcleo 4-hidroxi-piridina (cabeça cíclica), seguida de uma cadeia lateral ramificada e insaturada (cauda hidrofóbica). Tal aparência estrutural se assemelha com a da Coenzima Q (CoeQ; ubiquinona). A CoeQ é responsável pela transdução energética na cadeia respiratória mitocondrial. Em essência, a estrutura de potentes inibidores naturais do complexo I tem uma similaridade modular com ubiquinona, com uma "cabeça" cíclica correspondente à CoeQ e uma "cauda" hidrofóbica" (ESPOTI, 1998).

O mecanismo de ação da Piericidina A1 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 & TAMURA,

1966; YOSHIDA, SHIRAIISHI & TAKAHASHI, 1977). Essa semelhança estrutural entre a Piericidina A1 e a Coenzima Q, sugerem que a Piericidina A1 age como um antagonista da CoeQ. Isto já foi confirmado em estudos anteriores, que mostraram que as Piericidinas são potentes e específicos inibidores da NADH: ubiquinona oxidorreductase (Complexo I) na cadeia transportadora de elétrons (HALL *et al.*, 1966; SHIRAIISHI & TAKAHASHI, 1977; ZHOU & FENICAL, 2016).

Visto seu local de ação, os primeiros estudos realizados com as PA1 afirmavam que a mesma possuía promissora atividade biológica para uma grande variedade de inseticidas, agentes antibióticos, e também antifúngicos (SURUP *et al.*, 2008). Posteriormente a essas descobertas, novos estudos com essa molécula foram realizados e os mesmos reportaram a ordem de grandeza de sua potência contra algumas linhagens tumorais em concentrações muito baixas (SCHNERMANN *et al.*, 2006; HAYAKAWA *et al.*, 2007; HWANG *et al.*, 2008; KITAGAWA *et al.*, 2010; SINGH *et al.*, 2013), esses dados corroboram com os nossos achados, onde a PA1 possuiu atividade inibitória na linhagem de câncer colorretal (HCT-116) em concentrações na ordem de grandeza de atomolar (aM). Esses resultados chamaram a atenção pela potente atividade da PA1.

Em estudo feito por FATO *et al.* em 2009, foi evidenciado que a PA1, quando utilizada em baixas concentrações, é capaz de bloquear a transferência de elétrons na mitocôndria sem induzir a formação de ROS, porém, em altas concentrações, além de bloquear a transferência de elétrons, a substância induz a produção das espécies de oxigênio reativos. Portanto, o estresse oxidativo gerado pela PA1, seria responsável pela citotoxicidade. Sendo assim, em HCT-116, provavelmente, nas maiores concentrações de PA1 testadas (12 μ M e 3,8 nM), a alta taxa de inibição da proliferação celular pode estar relacionada com a produção de ROS somada à diminuição da eficiência energética, enquanto que, a partir de uma dada concentração mais baixa (24 pM a 0,1 aM), a proliferação celular diminui, mas não cessa totalmente, o que pode estar relacionado à diminuição do metabolismo celular causado pelo bloqueio da cadeia respiratória mitocondrial. Esses fatores mencionados anteriormente variam em grau de inibição de acordo com a linhagem testada. Em B16-F10, a inibição da proliferação celular ocorre nas duas maiores concentrações de PA1 (12 μ M e 3,8 nM), mas nas concentrações mais baixas (24 pM a 0,1 aM), a inibição celular é cessada, isso sugere que as duas linhagens possuem taxas de resistência diferentes quando tratadas com PA1. No presente estudo a linhagem B16F10 foi considerada mais resistente para PA1 se comparada à HCT-116. Apesar de ocorrer inibição do crescimento celular nas duas

maiores concentrações (12 μM e 3,8 nM) testadas em B16F10, é verificado que esse efeito inibitório é praticamente anulado nas concentrações seguintes (24 pM a 0,1 aM), enquanto que, em HCT-116, a inibição celular ocorre de forma mais acentuada nas concentrações mais altas (12 μM e 3,8 nM) e o perfil inibitório se mantém até mesmo na última concentração testada (24 pM a 0,1 aM).

Essas diferenças de respostas nas células testadas pode ser devida ao fato de as células tumorais desenvolverem mecanismos fisiológicos complexos que possibilitam a reprogramação do metabolismo energético (HANAHAN & WEINBERG, 2011). Diversos tipos de células tumorais apresentam um aumento da captação de glicose e elevada taxa glicolítica. Tais alterações metabólicas promovem vantagem ao crescimento ou sobrevivência dessas células (GATENBY & GILLIES, 2004).

As células de câncer além de possuírem a capacidade de alterar o metabolismo celular, são capazes de promover um suporte para algumas necessidades fundamentais da proliferação descontrolada: rápida geração de ATP para manutenção do estado energético, aumento da biossíntese de macromoléculas, e manutenção do estado redox apropriado (CAIRNS, HARRIS & MAK, 2011).

O perfil metabólico melhor caracterizado para este processo envolvendo a PA1 é o chamado efeito Warburg, que envolve a substituição do ATP produzido pela fosforilação oxidativa da cadeia respiratória mitocondrial, por ATP proveniente da via glicolítica, mesmo em condições normais de oxigênio. Embora a produção de ATP pela glicólise seja mais rápida do que a fosforilação oxidativa, ela é menos eficiente em termos de produção de ATP por molécula de glicose consumida. Tal alteração metabólica exige que a célula tumoral efetue uma elevada e anormal taxa de captação de glicose para suprir as suas necessidades de aumento energético, biossíntese e equilíbrio do estado redox (ALBERTS *et al.*, 1998; CAIRNS, HARRIS & MAK, 2011).

Tendo em vista as alterações bioquímicas no metabolismo que a PA1 causa nas células, e sabendo também do amplo potencial metabólico diferenciado inerentes às células tumorais, buscamos investigar se com um pré-tratamento em concentrações de PA1 500 femtomolar (500 fM), as células apresentariam alguma alteração em sua sensibilidade quando expostas a um quimioterápico.

No presente estudo utilizamos a Doxorrubicina como quimioterápico para o nosso teste de sensibilidade. Após o pré-tratamento das células tumorais com PA1 a 500fM, pudemos observar que a PA1 induziu ambas linhagens quando tratadas com o quimioterápico, obtiveram um acréscimo significativo em seus valores de CI_{50} . Isso

sugere que a PA1, além de causar inibição celular, possui também a capacidade de gerar alterações no metabolismo das células pré-tratadas com PA1.

Os efeitos da PA1 em células tumorais podem ser 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). Entretanto, tumores com as mesmas alterações genéticas podem possuir perfis de metabolização diferentes, dependendo do tecido em que se originam, o que indica que o microambiente tecidual influencia fortemente a atividade metabólica de células tumorais (SCHULZE & HARRIS, 2012). Isto pode explicar a diferença na atividade da PA1 para as linhagens celulares tumorais testadas neste estudo, sugerindo um perfil de metabolização diferenciado entre elas.

A resistência da linhagem B16-F10 à PA1 pode ser devida às complexas alterações bioquímicas geradas pela ativação de vias de resistência que essas células possuem. Outro fator importante é o NADPH, produto da alteração metabólica de células cancerígenas, que 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 & MAK, 2011).

Em cerca de 50% dos casos de melanoma há uma mutação no gene B-RAF, um gene humano classificado como proto-oncogene (um gene normal que, em razão da mutação, se torna um oncogene, ou seja, capaz de, por exemplo, levar a maior proliferação celular). Esta mutação ativa a MAPKinase, uma importante via de sinalização intracelular que emite estímulos de proliferação para a célula (GOEDERT *et al.*, 2016). Outro gene que possui relevante importância para o desenvolvimento de resistência na célula tumoral é o gene supressor de tumor p53. Ele 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). Sendo assim, a deficiência ou deleção do p53 em células tumorais, recapitula seu metabolismo para as consequências metabólicas do efeito Warburg, que, poderia supostamente explicar a resistência de células B16-F10 ao tratamento com PA1.

A utilização da glicose como fonte de energia para a manutenção vital e viabilização da proliferação de células tumorais, possivelmente funciona como sendo uma válvula de escape para os efeitos que PA1 exerce sobre as mesmas (bloqueio da

cadeia transportadora de elétrons, resultando em deficiência energética mais alterações na produção de ROS).

Ainda em busca de respostas sobre as alterações ocorridas nas células tumorais quando tratadas com PA1 a 500fM, realizamos um teste de migração celular (*Wound healing*) para verificar se, além da quimiorresistência adquirida pelas células tratadas com PA1, elas também iriam apresentar mudanças em sua capacidade migratória. Neste teste optamos pela linhagem celular de melanoma metastático (B16-F10), para verificar se ocorreriam alterações em sua capacidade migratória. Essa linhagem pode representar um instrumento útil nas pesquisas sobre melanoma e, portanto, estudos utilizando essa linhagem podem ser bastante úteis para o estabelecimento das possíveis relações desse modelo murino com o câncer humano, bem como para a compreensão dos fenômenos de invasão e metástases.

Através do teste de migração, pudemos observar que as células tratadas com PA1 a 500fM apresentaram uma maior capacidade migratória se comparada com as células não tratadas. Utilizamos um composto antiproliferativo (mitomicina C) para que fosse comprovado que o fechamento do risco/cicatriz foi devido à migração e não à proliferação celular. O teste de migração corroborou com nossos dados de que a PA1 estaria induzindo resistência na célula tumoral.

Estudos mostram que o desenvolvimento tumoral é marcado por um conjunto de variáveis que levam as células a adquirirem um fenótipo altamente adaptado (HANAHAN, 2011). A invasão celular e metástase são o resultado da progressão de células malignas, e estão intimamente relacionadas ao mal-prognóstico do paciente. Estes processos resultam de várias etapas, como: separação de algumas células do tumor primário, penetração destas através da membrana basal, migração das células ao longo da matriz extracelular (MEC), extravasamento destas para os vasos sanguíneos, adesão das células tumorais ao endotélio vascular, extravasamento das células pelos capilares do órgão/tecido alvo e, por fim, a formação dos tumores secundários. Para que este processo ocorra, diversas etapas são consideradas indispensáveis, dentre elas a motilidade celular e invasividade (AKIYAMA *et al.*, 1995).

Compostos capazes de inibir uma ou mais das etapas da cascata metastática, tornam-se importantes candidatos no desenvolvimento de substâncias antimetastáticas, condição urgente, hoje, devido aos tratamentos das metástases avançadas serem ineficazes. Porém, é de extrema importância estudar se alguns compostos são capazes de gerar alterações nas células ou no microambiente tumoral de forma a induzir ou

potencializar algumas das etapas envolvidas no surgimento da metástase (THIERY, 2003; ALBERTS *et al.*, 2006; KALLURI & WEINBERG, 2009).

Adicionalmente a isso, estudos mostraram que a diminuição do pH extracelular (pHe) também induz alterações semelhantes à transição epitélio mesenquimal (TEM) em células de melanoma humano, podendo ser um importante fator microambiental na indução de metástases (KATO *et al.*, 2013; PEPPICELLI *et al.*, 2014). Isso condiz com o que ocorre no câncer estudado *in vivo*, visto que o pHe ácido (mais ácido quando comparado ao pH fisiológico) é uma característica importante de tumores sólidos, o que pode induzir metástase tumoral (ROFSTAD *et al.*, 2006).

Em nossos testes de citotoxicidade, observamos que células B16-F10 quando tratadas com PA1 em variadas concentrações (120 μ M a 2 zM), apresentou uma mudança de coloração em seu meio de cultura, que possui um corante vermelho como indicador de pH (*phenol red*). Após as 72h de tratamento, o meio teve a cor alterada de vermelho para amarelo, indicando que o meio estava mais ácido, diferente do que foi observado nos meios das células do controle negativo e positivo. Isso sugere que a PA1 altera o metabolismo celular da B16-F10 de forma que ela passa a produzir compostos mais ácidos, acidificando o meio e provavelmente gerando as alterações mostradas nos estudos. Essa mudança de coloração não foi visualizada nas linhagens celulares HCT-116.

Diante dos resultados obtidos no teste de migração celular em B16-F10, procuramos analisar as células por microscopia confocal afim de comparar o perfil morfológico das células tratadas com PA1 com as não tratadas, bem como observar a disposição dos filamentos de actina e verificar a existência de alguma alteração nuclear. Através dessa técnica, foi possível observar que as células tratadas com PA1 a 500fM apresentaram uma morfologia mais filamentosa/fusifforme do que as células não tratadas. Os filamentos de actina não estavam organizados de forma homogênea como observado nos controles. Os núcleos não apresentaram alterações aparentes. Essas características mostram que a PA1 induziu alterações bioquímicas nas células, sendo capaz de modificar suas respostas químicas, induzindo quimiorresistência e modificando também a morfologia celular.

Estudos realizados por ALBERTS *et al.* em 2006 mostraram que células submetidas a ambientes mais ácidos, tiveram o desenvolvimento do fenótipo típico de células mesenquimais (fibroblástico). Utilizando linhagem de melanoma murino, eles também verificaram que o pH extracelular (pHe) ácido induz a expressão de

metaloproteinases, que são proteinases da matriz extracelular (MEC), zinco-dependentes, envolvidas no processo inicial da carcinogênese por permitirem a invasão tumoral na célula e promoverem o processo de metastatização; e a indução da capacidade migratória das células submetidas a um meio mais ácido. Esses estudos citados anteriormente corroboram para o que foi encontrado no presente trabalho. Células B16-F10 tratadas com PA1 apresentaram uma alteração ainda mais evidenciada no seu formato fusiforme quando comparadas às células não tratadas.

Nossos achados mostram que a PA1 possui um interessante potencial biotecnológico, podendo ser capaz de induzir alteração no fenótipo das células incubadas previamente com PA1, deixando-as com um fenótipo semelhante ao de célula mais agressiva. Esses dados sugerem que a PA1 provavelmente não deva ser utilizada na clínica como um composto anticâncer, visto que ela gera alterações que poderiam favorecer a sobrevivência celular e possivelmente progressão tumoral. No entanto, os resultados obtidos a colocam como uma potencial substância para ser utilizada com ferramenta farmacológica, podendo contribuir com o melhor entendimento sobre vias e metabolismo das células tumorais, que ainda são pouco compreendidas.

7 CONCLUSÃO

Os actinomicetos de sedimento de Fernando de Noronha são uma importante fonte de substâncias com potencial biotecnológico e farmacológico. A cepa BRA-399, dali recuperada, foi reconhecida como produtora de diferentes moléculas do grupo das Piericidinas, de onde a Piericidina A1, a mais abundante entre elas, foi isolada. Esta substância mostrou-se bastante bioativa contra duas linhagens de células tumorais, induzindo alterações no metabolismo celular, inibição da proliferação, alteração do fenótipo celular e migração celular.

Apesar de PA1 ter sua ocorrência já descrita, nenhum trabalho foi realizado para avaliar a sua atividade citotóxica nesse nível, podendo este ser o primeiro relato sobre suas propriedades induzindo alterações fenotípicas e indução da migração em células tumorais, abrindo assim a perspectiva de seu uso como um potencial ferramenta farmacológica auxiliando nos estudos relacionados ao câncer.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACS. American Cancer Society, 2016. Disponível em: <<http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002550-pdf.pdf>>. Acesso em: 13 maio 2016.

AKIYAMA, S.K.; AOTA, S.; YAMADA, K.M. Function and receptor specificity of a minimal 20 kilodalton cell adhesive fragment of fibronectin. *Cell Communication and Adhesion*. v. 3(1) p.13-25, 1995

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

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Biologia molecular da célula. 4 ed. São Paulo (SP): **Artmed**; 2006.

ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não-específicos que interagem com o DNA: Uma Introdução. **Química Nova**, v.28, n.1, p.118-129, 2005.

ALVES, R. R. N., ROSA, I. L. Biodiversity, traditional medicine and public health: where do they meet? *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 3:1-9. 2007.

ALVES, C. P.; MORAES, M. H.; SOUSA, J. F.; PONTES, C. L. S.; YOKOYAMA, S.; TRINDADE, D. M.; ESPREAFICO, E. M. Myosin-Va Contributes to Manifestation of Malignant-Related Properties in Melanoma Cells. *Journal of Investigative Dermatology*. 133(12): doi:10.1038/jid.2013.218, 2013.

ANDRÉO, M. A.; JIMENEZ, P. C.; SIEBRA, J. B. C. N.; COSTA-LOTUFO, L. V.; VESSECCHI, R.; NIEHUES, M.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Systematic UPLC-ESI-MS/MS studies of the occurrence of staurosporine and derivatives in marine microorganisms from *Eudistoma vancouveri*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2012.

ARTHAUD, I. D. B.; RODRIGUES, F. A. R.; JIMENEZ, P. C.; MONTENEGRO, R. C.; ANGELIM, A. L.; MELO, V. M. M.; SILVEIRA, E. R.; FREITAS, H. P. S.;

SOUSA, T. S.; PESSOA, O. D. L.; LOTUFO, T. M. C.; COSTA-LOTUFO, L. V. Studies on the secondary metabolites of a *Pseudoalteromonas* sp. isolated from sediments collected at the northeastern coast of Brazil. *Chemistry & Biodiversity*, 2011.

BALDERAS-RENTERIA, I. et al. Anticancer drug design using scaffolds of β -Lactams, sulfonamides, quinoline, quinoxaline and natural products. Drugs advances in clinical trials. *Current Medicinal Chemistry*, v. 19, p.4377-4398, 2012.

BATISTELLA, M. Cartografia Ecológica do Arquipélago de Fernando de Noronha. São Paulo, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 236p. (Tese de Mestrado), 1993.

BECERRIL-ESPINOSA, A. et al. Marine Actinobacteria from the Gulf of California: diversity, abundance and secondary metabolite biosynthetic potential. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 103, n. 4, p. 809–19, doi:10.1007/s10482-012-9863-3, 2013.

BRITO, G.A.; CARNEIRO-FILHO, B.; ORIA, R.B.; DESTURA, R.V.; LIMA, A.A.; GUERRANT, R.L. Clostridium difficile toxin A induces intestinal epithelial cell apoptosis and damage: role of Gln and Ala-Gln in toxin A effects. *Digestive Diseases and Sciences* v.50, n.7, p.1271-1278, 2005.

BOEUF, G. Marine biodiversity characteristics. *Comptes Rendus Biologies*. v.334, n.435, 2011.

BURK, R.R. A factor from a transformed cell line that affects cell migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA, v.70, p.368-372, 1973

CARVALHO, K. D. C., PARANHOS, R. Análise de Abundância Bacteriana no Estudo da Ecologia Microbiana de Sedimentos Marinhos. *Oecologia Australis*. 14(2): 415-436, 2010.

COSTA-LOTUFO, L. V., JIMENEZ, P. C., WILKE, D. V.; EPIFANIO, R. A. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: Historico & perspectivas. *Química Nova*, XY, 114, 2009.

COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N., MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química.**, 2 (1), 47-58. 2010.

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. Impact of Natural Products on Developing new anticancer agents. **Chemical Reviews.** 109: 3012-3043. 2009.

CRAGG, G. M., NEWMAN, D. J., SNADER, K. M. Natural products in drug discovery and development. **Journal of Natural Products.**; 60: 52-60, 1997.

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.

DAS, S.;; LYLA, P. S. e AJMAL KHAN, S. Distribution and generic composition of culturable marine actinomycetes from the sediments of Indian continental slope of Bay of Bengal. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 26, n. 2, p. 166–177, doi:10.1007/s00343-008-0166-5, 2008.

ENDO, A.; DANISHEFSKY, S. J. Total Synthesis of Salinosporamide A. **Journal of the American Chemical Society**, 127(23), p. 829899, 2005.

ESPOTI, M. D. Inhibitors of NADH–ubiquinone reductase: an overview. **Biochimica et Biophysica Acta.** 1364 (222–235), 1998.

FATO, R.; BERGAMINI, C.; BORTOLUS, M.; MANIERO, A. L.; LEONI, S.; OHNISHI, T.; LENZA, G., Differential effects of mitochondrial Complex I inhibitors on production of reactive oxygen species. **Biochimica et Biophysica Acta.** 1787(5): 384–392, 2009.

FELING, R. H., BUCHANAN, G. O., MINCER, T. J., KAUFFMAN, C. A., JENSEN, P. R., FENICAL, W. Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinospira*. **Angewandte Chemie International Edition**, 42, pp. 355–357, 2003.

FENICAL, W.; JENSEN, P. R.; PALLADINO, M. A.; LAM, K. S.; LLOYD, G. K.; POTTS, B. C. Discovery and development of the anticancer agent salinosporamide A (NPI0052). *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(6), p. 217580, 2009.

FENICAL, W.; JENSEN, P. R. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nature Chemical Biology*, 2, 666673, 2006.

FENICAL, W. Marine Pharmaceuticals: Past, Present, and Future. *Oceanography*, 19(2), 110119, 2006.

FENICAL, W. Chemical studies of marine bacteria: developing a new resource. *Chemical Reviews*, 93, 1673–1683, 1993.

FERREIRA, E.G.; TORRES, M. D.; SILVA, A. B.; COLARES, L.L.; PIRES, K.; LOTUFO, T.M.; SILVEIRA, E.R.; PESSOA, O. D.; COSTA-LOTUFO, L. V.; JIMENEZ, P.C. Prospecting Anticancer Compounds in Actinomycetes Recovered from the Sediments of saint Peter and Saint Paul's Archipelago, Brazil. *Chemistry & Biodiversity*. Sep;13(9):1149-1157. 2016

FERREIRA, E. G.; WILKE, D. V.; JIMENEZ, P. C.; OLIVEIRA, J. R.; PESSOA, O. D. L.; SILVEIRA, E. R.; VIANA, F. A.; PESSOA, C.; MORAES, M. O. de; HAJDU, E.; COSTA-LOTUFO, L. V. Guanidine alkaloids from *Monanchora arbuscula*: chemistry and antitumor potential. *Chemistry & Biodiversity*, v. 8, p. 1433, 2011.

FERREIRA, E. G.; WILKE, D.V.; JIMENEZ, P. C.; PORTELA, T. A.; HAJDU, E.; PESSOA, C. O.; MORAES, M. O.; LOTUFO, L. V. C. In: Custódio MR; Lôbo-Hajdu G; Hajdu E; Muricy M. (Org.). *Porifera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability*. 1 ed. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 28, 313, 2007.

FRESHNEY, I.R. Culture of animal cells. A manual of Basic Technique. 3° ed. New York, **Wiley-Liss**. 1994.

GIVAN, A. L. Flow Cytometry. In: HAWLEY, T. S.; ROBERT G HAWLEY (Eds.). *Methods in Molecular Biology: Flow Cytometry Protocols*. 2a. ed. Totowa: Humana Press. v. 263p. 434, 2004.

GOEDERT, L.; PEREIRA, C. G.; ROSZIK, J.; PLAÇA, J. R.; CARDOSO, C.; CHEN, G.; DENG, WANLENG.; YENNU-NANDA, V. G.; JUNIOR, W. A. S.; DAVIES, M. A.; ESPREAFICO, E. M. RMEL3, a novel BRAF^{V600E}-associated long noncoding RNA, is required for MAPK and PI3K signaling in melanoma. *Oncotarget*, Vol.7, No. 24, 2016.

GUIDO, R. V. C. et al. Virtual screening and its integration with modern drug design technologies. *Current Medicinal Chemistry* ., v.15, n.1, p.37-46, 2008

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova*, 33(3), 667679, 2010.

GUIMARÃES, L. A.; JIMENEZ, P. J.; SOUSA, T. S.; FREITAS, H. P. S.; ROCHA, D. D.; WILKE, D. V.; MARTÍN, J.; REYES, F.; PESSOA, O. D. L.; COSTA-LOTUFO, L. V. Chromomycin A2 Induces Autophagy in Melanoma Cells. *Marine Drugs*, 12, 5839-5855; doi:10.3390/md12125839, 2014.

HALL, C.; WU, M.; CRANE, F.; TAKAHASHI, H.; TAMURA, S.; FOLKERS, K. Piericidin A: a new inhibitor of mitochondrial electron transport. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 25, 373-377, 1966.

HALL, H. I.; JAMISON, P.; FULTON, J. P.; CLUTTER, G.; ROFFERS, S.; PARRISH, P. Reporting cutaneous melanoma to cancer registries in the United States. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 4:624-30, 2003.

HAMEŞ-KOCABAŞ, E. E. e UZEL, A. Isolation strategies of marine-derived actinomycetes from sponge and sediment samples. *Journal of microbiological methods*, v. 88, n. 3, p. 342– 7, doi:10.1016/j.mimet.2012.01.010, 2012.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, v.144, p. 646-674, 2011.

HARVEY, A. L. Natural Products in Drug Discovery. *Drug Discovery Today*, v. 13, p. 894901, 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.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E. M. H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 3233–3241, 1997.

HILL, R. T.; FENICAL, W. Pharmaceuticals from marine natural products: surge or ebb? *Current opinion in biotechnology*, v. 21, n. 6, p. 777–9, 2010.

HOUGHTON, P.; FANG, R.; TECHATANAWAT, I.; STEVENTON, G.; HYLANDS, P. J.; LEE, C. C; The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. *Methods*. 42 (4): 377-87, 2007.

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, 2008

INCA, Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **INCA**. 118p. 2016. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016>>. Acesso em: nov. 2016.

INCA, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Brasil. Ministério da Saúde. **Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2014.

JEMAL, A. et al. Global cancer statistics. *Cancer Journal Clinical.*, v. 61, p. 69-90, 2011.

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. et al. Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. **Environmental microbiology**, v. 7, n. 7, p. 1039–48, 2005.

JIMENEZ, P. C. et al. Structure elucidation and anticancer activity of 7-oxostaurosporine derivatives from the Brazilian endemic tunicate *Eudistoma vannamei*. **Marine drugs**, v. 10, n. 5, p. 1092–102, 2012.

JIMENEZ, P. C. **Estarosporinas de *Eudistoma Vannamei*: Química e bioatividade**. 2009. 128 f. Tese (Doutorado) Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

JIMENEZ, P. C.; WILKE, D. V.; TAKEARA, R.; LOTUFO, T. M. C.; PESSOA, C.; MORAES, M. O. de; LOPES, N. P.; COSTA-LOTUFO, L. V. Cytotoxic activity of a dichloromethane extract and fractions obtained from *Eudistoma vannamei* (Tunicata: Ascidiacea). **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology**, v. 151, p. 391398, 2008.

JIMENEZ, P. C., WILKE, D. V., TAKEARA, R., LOTUFO, T. M. C., PESSOA, C. O., MORAES, M. O., LOPES, N. P., COSTA-LOTUFO, L. V. Preliminary studies on the cytotoxic activity of a dichloromethane extract and fractions obtained from *Eudistoma vannamei* (Tunicata: Ascidiacea). **Comparative Biochemistry and Physiology C**, 151, 391398, 2008.

JIMENEZ, P. C. **Bioprospecção de substâncias com potencial antimoral em ascídias do litoral cearense: estudos com *Eudistoma vannamei* Millar, 1977 (Urochordata, Ascidiacea)**. 93f. Dissertação (Mestrado) Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

JIMENEZ, P. C.; TEIXEIRA, G. L. S.; WILKE, D. V.; NOGUEIRA, N. A. P.; HAJDU, E.; PESSOA, C.; MORAES, M. O. de; COSTA-LOTUFO, L. V. Cytotoxic and

antimicrobial activities of hidromethanolic extracts of sponges (PORIFERA) from Ceara state, Brazil. *Arquivos de Ciências do Mar*, v. 37, 2004.

KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation*; 119:1420-8, 2009.

KATO, Y.; OZAWA, S.; MIYAMOTO, C.; MAEHATA, Y.; SUZUKI, A.; MAEDA, T.; BABA, Y. Acidic extracellular microenvironment and cancer. *Cancer Cell International*,13:89, 2013.

KEEPERS, Y.P.; PIZAO, E.P.; PETERS, G. J.; VAN, ARK-OTTE, J.; WINOGRAD, B.; PINEDO, H. M. Comparison of the sulphorhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing. *European Journal of Cancer*. 27(7): 897-900, 1991.

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.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33, 1870-1874, 2016.

LAM, K. S. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Current Opinion of Microbiology*, 9, 245251, 2006.

LI, QUINYUAN; Chen, XIU; JIANG, YI and JIANG, CHENGLIN. Morphological Identification of Actinobacteria. InTech Book, DOI: 10.5772/60457, 2016.

LIMA-FILHO, M. M. de. **Estudo do Potencial citotóxico e antimicrobiano de dois antozoários (Cnidaria) dos gêneros *Protopalythoa* e *Palythoa***. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

LIN, J. H. Structure- and Dynamics-Based computational design of anticancer drugs. *Biopolymers*, v. 105, n. 1, p. 2-9, 2015.

LINDEQUIST, U. Marine-Derived Pharmaceuticals – Challenges and Opportunities. *Biomolecules & Therapeutics*, 24(6), 561-571, 2016.

MALDONADO, L.A.; FENICAL, W.; JENSEN, P.R; KAUFFMAN, C.A.; MINCER, T.J.; WARD, A.C.; BULL, A.T. and GOODFELLOW, M. *Salinispora arenicola* gen. nov., sp. nov. and *Salinispora tropica* sp. nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family Micromonosporaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55: 1759-1766, 2005.

MANIVASAGAN, P. et al. Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. *Microbiological research*, 2013.

MARTIN-CUADRADO, A. B.; LOPEZ-GARCIA, P.; ALBA, J. C.; MOREINA, D.; STRITTMATTER, A. Metagenomics of the deep Mediterranean, a warm Bathypelagic habitat. *PLoS ONE* 2, e914. 2007.

METZ, H. L. Microscópio Confocal. Campinas: UNICAMP, 2004. Disponível em: <http://www.ifi.unicamp.br/~lunazzi/F530_F590_F690_F809_F895/F530_F590_F690_F895/F530_F590_F690_F895_sem2_2004/003069Hugo_M_Franchini_F530_RF.pdf>. Acessado em 15 de setembro de 2016.

MOLINSKI, T. F.; DALISAY, D. S.; LIEVENS, S.L.; SALUDES, J. P. Drug development from marine natural products. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8, 6985, 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, 2010

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, p. 5563, 1983.

NARANG, A. S.; DESAI, D. S. Anticancer Drug development: Unique aspects of pharmaceutical development. *Pharmaceutical Perspectives of Cancer Therapeutics*, 2009.

NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI). Disponível em: <<http://www.cancer.gov/>>. Acesso em: 18 ago. 2016.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica de Lehninger. Porto Alegre: **Artmed**, 6. ed, 2011.

NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M. Drugs and Drug Candidates from Marine Sources: Na Assessment of the Current “State of Play”. *Journal Natural Products*. v.79(3), p.629-661, 2016.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Marine Natural Products and Related Compounds in Clinical and Advanced Preclinical Trials. *Current Medicinal Chemistry*, Vol.11(13), pp.1693-1713, 2004.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, v. 75, p. 311-335, mar. 2012.

O'BRIEN, J.; WILSON, L.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, v. 267, p. 5421-5426, 2000.

OKUN, J. G.; LÜMMEN, P.; BRANDT, U. Three Classes of Inhibitors Share a Common Binding Domain in Mitochondrial Complex I (NADH:Ubiquinone Oxidoreductase). The *Journal of Biological Chemistry*, v. 274, n. 5, p. 2625–2630, 1999.

OLANO, C.; MÉNDEZ, C.; SALAS, J. A. Antitumor Compounds from Marine Actinomycetes. *Marine Drugs*, 7(2), 210248, 2009.

OLIVEIRA, S. M. B.; PESSEDA, L. C. R.; BABINSKI, M.; GIOIA, S. M. C. L.; FÁVARO, D. I. T. Solos Desenvolvidos Sobre Diferentes Rochas Vulcânicas da Ilha de Fernando de Noronha: Padrão de Elementos Terras Raras e Composição Isotópica do Chumbo. *Revista do Instituto de Geociências - USP*. v. 11, n. 3, p. 97-105, 2011.

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.

ÖZCAN, K. et al. Diversity and antibiotic-producing potential of cultivable marine-derived actinomycetes from coastal sediments of Turkey. *Journal of Soils and Sediments*, v. 13, n. 8, p. 1493–1501, doi:10.1007/s11368-013-0734-y, 2013.

PEPPICELLI, S.; BIANCHINI, F.; TORRE, E.; CALORINI, L. Contribution of acidic melanoma cells undergoing epithelial-to-mesenchymal transition to aggressiveness of non-acidic melanoma cells. *Clinical & Experimental Metastasis*, 31:423–433, 2014.

PHONGSOPITANUN, W., THAWAI, C., SUWANBORIRUX, K., KUDO, T., OHKUMA, M. and TANASUPAWAT, S. *Streptomyces chumphonensis* sp. nov., isolated from marine sediments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 2605-2610. 2014.

PONCIANO, D. B, *et al.* Dosing of endoxifen in patients with breast cancer: new tools for monitoring therapeutic. *Revista Brasileira de Farmacologia*. 93(4): 415-421, 2012

RAGER, E. L.; BRIDGEFORD, E. P.; OLLILA, D. W. Cutaneous melanoma: update on prevention, screening, diagnosis, and treatment. *American Family Physician*, 72:269-76, 2005.

RAVIKUMAR, S.; FREDIMOSSES, M.; GNANADESIGAN, M. Anticancer Property of Sediment Actinomycetes Against MCF-7 and MDA-MB-231 Cell Lines. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2(2):92-96. 2012.

REDDY, L. R.; SARAVANAN, P.; COREY, E. J. *Journal of the American Chemical Society*, 126, 6230, 2004.

RIBEIRO, M. R.; MARQUES, F. A.; LIMA, J. F. W. F.; JACOMINE, P. K. T.; TAVARES-FILHO, A. N.; LIMA-NETO, J.A. Levantamento detalhado de solos do Distrito Estadual de Fernando de Noronha-PE. Anais. Recife, **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, 2005.

ROBERTS, C.M. Marine Biodiversity Hotspots and Conservation Priorities for Tropical Reefs. *Science*. v.295, n.1280, 2002.

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.

ROFSTAD, E. K.; MATHIESEN, B.; KINDEM, K.; GALAPPATHI, K. Acidic extracellular pH promotes experimental metastasis of human melanoma cells in athymic nude mice. *Cancer Research*, 66:6699–6707, 2006

RUBINSTEIN, L.V.; SHOEMAKER, K. D.; PAULL, R.M.; In Vitro Anticancer-Drug-Screening. *Journal of National Cancer Institute*. 82:1113-1118, 1990.

SAHM, B. D. B, Prospecção de Substâncias com Potencial Anticâncer em microrganismos associados ao zoantídeo *Protopolythoa variabilis* (Cnidaria, Anthozoa). Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Universidade Federal do Ceará. 2014.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4, 406– 425, 1987.

SAMWOGERERE, D; WEEKS, E. R. Confocal Microscopy. *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*. Taylor % Francis: Atlanta, Georgia, 2005.

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

SCHWARZENBERG, K.; VOLLMAR, A. M. Targeting apoptosis pathways by natural compounds in cancer: Marine compounds as lead structures and chemical tools for cancer therapy. *Cancer Letters*. 332, 295–303, 2013.

SIEGEL, R.; JEMAL, A. Colorectal Cancer Facts & Figures 2014-2016. *American Cancer Society*, Atlanta, Georgia, 2014.

SIEGEL, R.; JEMIN, M.; ZOU, Z.; JEMAL, A. Cancer Statistics. American cancer Society CA. *Cancer Journal Clinic*, v. 64, p. 9-29, 2014.

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.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of National Cancer Institute*. Jul 4;82 (13):1107-12, 1990.

SOUSA, T. S.; JIMENEZ, P. C.; FERREIRA, E. G.; SILVEIRA, E. R.; BRAZ-FILHO, R.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, O. D. L. Anthracyclines from *Micromonospora* sp. *Journal of Natural Products*, 2012.

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.

SUBRAMANI, R.; AALBERSBERG, W. Culturable rare Actinomycetes: diversity, isolation and marine natural product discovery. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 97, n. 21, p. 9291–321, doi:10.1007/s00253-013-5229-7, 2013.

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.

TAKEARA, R.; JIMENEZ, P. C.; WILKE, D. V., MORAES, M. O., PESSOA, C. O., LOPES, J. L. C., LOPES, N. P., COSTA-LOTUFO, L. V. Effects of isolates from a hidromethanolic extract of *Didemnum psammatoedes* (Tunicata: Ascidiaceae) on human leukemia cell lines. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 151, p. 363369, 2008.

TEIXEIRA, W.; CORDANI, U. G.; MENOR, E. A.; TEIXEIRA, M. G.; LINSKER, R. Arquipélago de Fernando de Noronha o paraíso do vulcão. São Paulo, **Terra Virgem**, 168p. 2003.

TUCKER, M. A.; GOLSDTEIN, A. M. Melanoma etiology: where are we? **Oncogene.**; 20:3042-52. 2003

TURLEY, C. M.; DIXON, J. L. Bacterial numbers and growth in surficial deep-sea sediments and phytodetritus in the NE Atlantic: Relationships with particulate organic carbon and total nitrogen. *Deep-Sea Research*, 49: 815-826. 2002.

VANNEMAN, M.; DRANOFF, G. Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, p.237-251, 2012.

VICENTE, J. et al. Biodiversity of actinomycetes associated with Caribbean sponges and their potential for natural product discovery. **Marine biotechnology (New York, N.Y.)**, v. 15, n. 4, p. 413–24, doi:10.1007/s10126-013-9493-4, 2013.

XIONG, Z.-Q. et al. Characterization of *Streptomyces padanus* JAU4234, a producer of actinomycin X2, fungichromin, and a new polyene macrolide antibiotic. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 2, p. 589–92, doi:10.1128/AEM.06561-11, 2012.

WAKSMAN, S. A., and HINRICI, A. T. The nomenclature and classification of the actinomycetes. **J. Bacteriol.** 46, 337, 1943.

WEINER, L. M.; MURRAY, J. C.; SHUPTRINE, C. W. Antibody-based immunotherapy of cancer: New insights, new targets. **Cell**, v.148, n.6, p.1081-1084, 2012.

WERMUTH, C. G. The practice of medicinal chemistry. **London: Academic Press.** 2003

WILKE, D. V.; JIMENEZ, P. C.; ARAÚJO, R. M; SILVA, W. M. B. da; PESSOA, O. D. L.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, C.; MORAES, M. O. de; SKWARCZYNSKI, M.; SIMERSKA, P.; TOTH, I.; COSTA-LOTUFO, L. V. Pro-apoptotic activity of lipidic α -amino acids isolated from *Protopolythoa variabilis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 79978004, 2010.

WILKE, D. V.; JIMENEZ, P. C.; PESSOA, C.; MORAES, M. O. de; ARAÚJO, R. M.; SILVA, W. M. B. da; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L.; BRAZ-FILHO, R.; LOPES, N. P.; COSTA-LOTUFO, L. V. Cytotoxic lipidic α -amino acids from the zoanthid *Protopolythoa variabilis* from the northeastern coast of Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 14551459, 2009.

WHO. World Health Organization, 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>> Acesso em: 5 dez. 2015.

YOSHIDA, S.; SHIRAISHI, S.; 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.

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.

ZHOU, X.; FENICAL, W. The unique chemistry and biology of the piericidins. **The Journal of Antibiotics**, 69, 582-593, doi:10.1038/ja.2016.71, 2016.

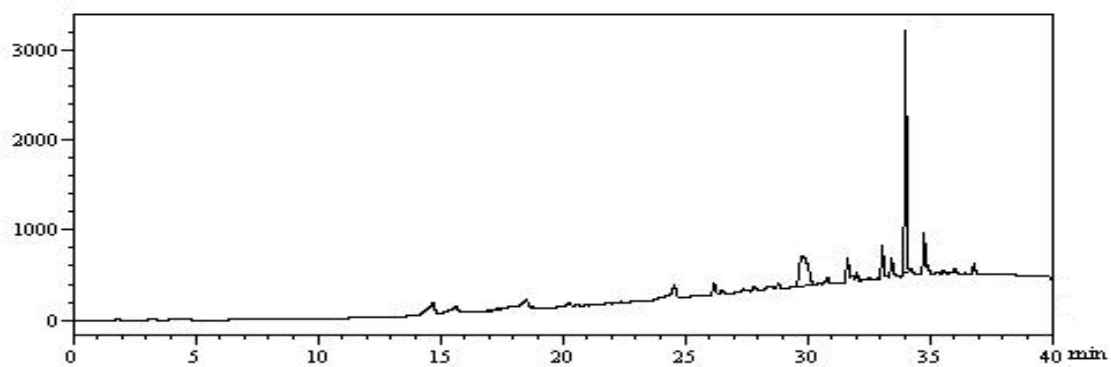
ANEXO I - Sequenciamento da BRA-399

>BRA399

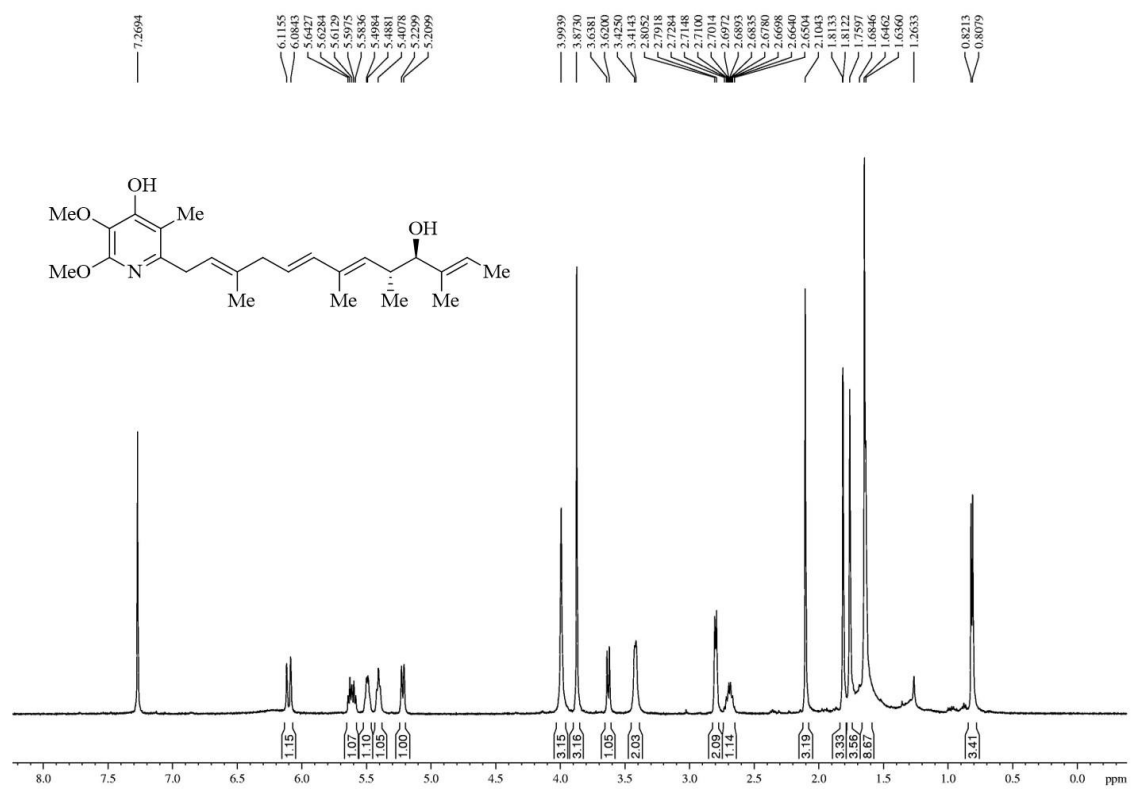
CACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATAC
CGGATACGACACAGGAGGGCATCTTCTCTGTGTGGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGAT
GAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGG
GTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACT
CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGC
GACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGA
AGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC
GCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGT
AGGCGGCTTGTCACGTTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTC
GATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTG
AAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGAT
ACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
TCCACGCCGTAAACGTTGGGAACTAGGTGTGGGCGACATTCCACGTCGTCCGTGCC
GCAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCA
AAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCA
ACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACATC

ANEXO II - Cromatogramas da Piericidina A1

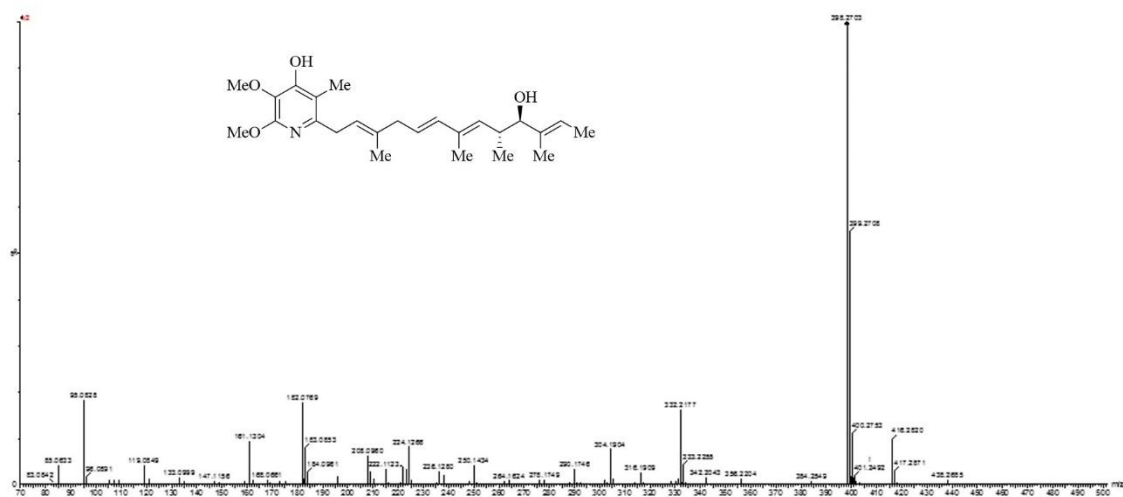
A) Cromatograma de monitoramento da fração BRA-399-B



B) Cromatograma de isolamento da Piericidina A1



C) Espectro de HR-LC-MS da Piericidina A1



ANEXO III - Tabela de conversão de unidades de grama

A) Submúltiplos de grama

Submúltiplos	Casas decimais
Miligrama (mg)	10^{-3} g
Micrograma (ug)	10^{-6} g
Nanograma (ng)	10^{-9} g
Picograma (pg)	10^{-12} g
Fentograma (fg)	10^{-15} g
Atograma (ag)	10^{-18} g
Zeptograma (zg)	10^{-21} g
Yoctograma (yg)	10^{-24} g

B) Conversão de nanograma para Molar

[ng/mL]	[Molar]
50.000	120 μ M
80	193 nM
0,026	6,3 pM
$8,1 \times 10^{-6}$	19,5 fM
$2,6 \times 10^{-3}$	6,3 aM
$8,3 \times 10^{-13}$	2 zM
$2,6 \times 10^{-6}$	0,63 yM

C) Conversão de submúltiplos de grama para Molar

[g/mL]	[Molar]
5 μ g/mL	12 μ M
1,6 ng/mL	3,8 nM
10 pg/mL	24 pM
6 ag/mL	14,4 aM
42 zg/mL	0,1 aM

