



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

LUCIANA COSTA FURTADO

**PROSPECÇÃO DE COMPOSTOS COM POTENCIAL ANTICÂNCER OBTIDOS DE
BACTÉRIAS RECUPERADAS DE ASCÍDIAS DA PRAIA DA TAÍBA - CE**

FORTALEZA

2017

LUCIANA COSTA FURTADO

PROSPECÇÃO DE COMPOSTOS COM POTENCIAL ANTICÂNCER OBTIDOS DE
BACTÉRIAS RECUPERADAS DE ASCÍDIAS DA PRAIA DA TAÍBA - CE

Monografia submetida à Coordenação do curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Diego Veras Wilke

FORTALEZA

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)

F987p Furtado, Luciana Costa.
Prospecção de compostos com potencial anticâncer obtidos de bactérias recuperadas de ascídias da praia da Taiba - CE / Luciana Costa Furtado. – 2017.
64 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. Diego Veras Wilke.

1. Citotoxicidade. 2. Micro-organismos marinhos. 3. Ascídias. I. Título.

CDD 570

À minha mãe e à minha irmã, pelo exemplo de amor, carinho e cuidado e por sempre apoiarem as minhas escolhas.

AGRADECIMENTOS

Ao **Dr. Diego Wilke** por todo aprendizado, entusiasmo, apoio e incentivo desde o início. Agradeço mais ainda pelo otimismo e a vontade de sempre ensinar mais, pelos conhecimentos diários, pela paciência e simpatia e por aceitar compartilhar suas ideias.

Ao **Dr. Elthon Gois**, meu “co-orientador”, que acompanhou os meus passos desde o início no mundo dos produtos naturais marinhos. Agradeço pela dedicação em me ajudar, pelos ensinamentos e pela amizade.

À minha querida amiga, **Dra. Andréa Oliveira**, por ter sido tão determinante nesse um ano de convivência. Obrigada por cada risada compartilhada, por cada conversa abraçada, pelas epifanias juntas, por ter me mostrado os caminhos certos, respeitando as minhas opiniões, por me confortar nos desesperos, por me acolher em sua casa e disponibilizar seu tempo para me ajudar a aprender. Déa, gratidão!

Aos amigos e às amigas do **LaBBMar**: Kayanny Ferreira, Katharine Gurgel, Alexia Assef, Erlânia Alves, Thaís Brito, Caroline Vasconcelos, Gabriela Brunno, Júlio Daniel, Raianna, Matheus Magalhães, Camila Roque, Danilo Damasceno e Prof. Amaro Silva. Queridos, obrigada por cada momento em que estivemos juntos, pelos aprendizados, pelas confraternizações, pelas risadas, pelas compreensões quando tão necessárias e pela ajuda nos experimentos.

Aos queridíssimos amigos do **ECOTOX**: Marcionília Pimentel, Évila Damasceno, Ivna Vasconcelos, Allyson Queiroz, Renan Daku e Allan Santos, os quais eu tive o enorme prazer de conhecer e conviver. A energia que vocês passam é singular. Obrigada por me receberem em suas vidas.

Às queridas **Larissa Guimarães** e **Evelyne Alves** por terem compartilhado comigo seus conhecimentos, me ensinando os primeiros passos no laboratório e acompanhando meus erros e acertos. Serei sempre grata.

Aos queridos do **LAFIPLAM**, em especial, **Profa. Dra. Otília Pessoa**, Ceiza Meneses, Chaguinha e Taynara Matos. Obrigada pelos momentos de aprendizado químico, pela paciência e pela parceria.

Ao **Dr. Kirley Canuto** e ao Dr. Paulo Ricelli da Embrapa pela ajuda com a análise das minhas amostras.

Ao Laboratório de Genética Molecular Humana – LGMH, do Departamento de Genética da Universidade Federal de Pernambuco pelo sequenciamento de parte das bactérias desse trabalho.

À minha mãe e minha irmã pela paciência de cada dia, pelo amor e carinho distribuídos, por me apoiarem, por serem meu porto seguro.

Ao CNPq e FUNCAP pelo apoio financeiro para com a manutenção da bolsa de auxílio.

RESUMO

Câncer é um conjunto de doenças que envolve o crescimento desordenado e espalhamento de células anormais e representa a segunda causa de morte da população mundial. A busca por novos fármacos é alvo de pesquisas para amenizar esse problema. Dentre as diversas fontes de novas moléculas, os produtos naturais marinhos apresentam um papel fundamental na descoberta de novos fármacos, representado por alguns fármacos aprovados para uso clínico contra o câncer e inúmeros em fase de testes pré-clínicos e clínicos, ressaltando a importância desse ambiente como fornecedor de compostos biologicamente ativos. O objetivo desse trabalho foi a descoberta de compostos com potencial anticâncer a partir de micro-organismos marinhos. Duas ascídias coletadas na praia da Taíba - CE, *Eudistoma vannamei* e *Euherdmania* sp., tiveram cultivada parte de suas bactérias associadas. Esse esforço rendeu o isolamento de 36 cepas, sendo 28 da *Euherdmania* sp. e 8 da *E. vannamei*. Todas as cepas foram crescidas em meio líquido e seus extratos brutos obtidos utilizando o solvente acetato de etila. Os extratos foram testados para verificação de atividade citotóxica em células tumorais de câncer colorretal, linhagem HCT-116, na concentração de 50µg/mL, utilizando-se o teste do MTT para identificação da porcentagem de células ainda viáveis. Metade dos extratos foram ativos, considerando aqueles que inibiram o crescimento das células tumorais entre 75 e 100%. As cepas BRA-342 e BRA-346 renderam extratos bastante potentes, com valores de concentração inibitória média de 0,59 e 0,03µg/mL, respectivamente. Esses extratos foram então fracionados, utilizando-se como princípio a diferença de polaridade e o tamanho molecular, e todas as frações obtidas foram testadas. Os resultados encontrados mostraram a identificação de prodigiosina para a cepa identificada como BRA-342, uma bactéria do gênero *Pseudovibrio*. Para a BRA-346, identificada com *Streptomyces* sp., até o momento foi possível prever a existência de algumas classes de metabólitos, entre elas, dicetopiperazinas, piericidinas e lipopeptídeos.

Palavras-chave: Ascídias. Micro-organismos Marinhos. Citotoxicidade.

ABSTRACT

Cancer is a set of diseases that involves the disordered growth and scattering of abnormal cells and is the second leading cause of death in the world population. The search for new drugs is being researched to alleviate this problem. Among the different sources of new molecules, marine natural products play a fundamental role in the discovery of new drugs, represented by some drugs approved for clinical use against cancer and several drugs in the pre-clinical and clinical tests phase, emphasizing the importance of this environment as supplier of biologically active compounds. The objective of this work was the discovery of compounds with anticancer potential from marine microorganisms. Two ascidians collected on the beach of Taíba - CE, *Eudistoma vannamei* and *Euherdmania* sp., had cultivated part of their associated bacteria. This effort yielded the isolation of 36 strains, 28 of *Euherdmania* sp. and 8 from *E. vannamei*. All strains were grown in liquid medium and their crude extracts obtained using the ethyl acetate solvent. The extracts were tested for cytotoxic activity in colorectal cancer cells, HCT-116, at the concentration of 50µg/mL, using the MTT test to identify the percentage of still viable cells. Half of the extracts were active, considering those that inhibited the growth of tumor cells between 75 and 100%. The BRA-342 and BRA-346 strains yielded very potent extracts, with mean inhibitory concentration values of 0,59 and 0,03µg/mL, respectively. These extracts were then fractionated using the principle of polarity difference and molecular size, and all fractions obtained were tested. The results showed the identification of prodigiosin for the strain identified as BRA-342, a bacterium of the genus *Pseudovibrio*. For BRA-346, identified with *Streptomyces* sp., to date it has been possible to predict the existence of some classes of metabolites, among them, diketopiperazines, piericidins and lipopeptides.

Keywords: Ascidians. Marine Bacteria. Cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|----------|--|----|
| Figura 1 | – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016-2017 por sexo, exceto pele não melanoma | 14 |
| Figura 2 | – Principais características de células tumorais..... | 16 |
| Figura 3 | – Planejamento experimental do presente estudo, mostrando as etapas em sequência de recuperação das bactérias associadas, crescimento e criopreservação dessas bactérias, obtenção dos extratos brutos e seu fracionamento, ensaio de avaliação da atividade citotóxica e identificação molecular das cepas..... | 24 |
| Figura 4 | – Ascídias coletadas na praia da Taíba. <i>Eudistoma vannamei</i> e <i>Euherdmani</i> sp., respectivamente..... | 25 |
| Figura 5 | – Mapa indicando o local de coleta das ascídias, praia da Taíba-CE..... | 26 |
| Figura 6 | – Fluxograma de fracionamento por exclusão molecular do extrato AcOEt de BRA-346..... | 33 |
| Figura 7 | – Estrutura química da prodigiosina..... | 41 |
| Figura 8 | – Fotos de bactérias recuperadas das ascídias <i>Eudistoma vannamei</i> e <i>Euherdmani</i> sp. que apresentaram extrato bruto com atividade citotóxica em linhagem celular HCT-116..... | 44 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | | |
|-----------|---|----|
| Gráfico 1 | - Número de colônias isoladas a partir da ascídia <i>Euherdmania</i> sp., utilizando os diferentes métodos e meios seletivos..... | 36 |
| Gráfico 2 | - Número de colônias isoladas a partir da ascídia <i>Eudistoma vannamei</i> utilizando os diferentes métodos e meios seletivos..... | 36 |
| Gráfico 3 | - Valores de porcentagem de inibição da proliferação celular dos extratos da bactérias isoladas da ascídia <i>Euherdmania</i> sp. na concentração de 50 µg/mL. | 37 |
| Gráfico 4 | - Valores de porcentagem de inibição da proliferação celular dos extratos da bactérias isoladas da ascídia <i>Eudistoma vannamei</i> na concentração de 50 µg/mL..... | 38 |
| Gráfico 5 | - Cromatogramas das frações e do extrato bruto cepa BRA 342..... | 40 |
| Gráfico 6 | - Cromatogramas do extrato bruto (EB) e frações D e E obtidas a partir do primeiro fracionamento da cepa BRA 346..... | 42 |
| Gráfico 7 | - Espectros das frações E, D e do extrato bruto (EB) da BRA-346 nos tempos de retenção (T_R) 3.761, 4.648 e 7.94 min..... | 43 |
| Gráfico 8 | - Cladograma de agrupamento para parte das cepas que apresentaram extrato com citotoxicidade..... | 51 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Compostos isolados de fontes marinhas aprovados pelo <i>Food and Drug Administration</i> (FDA) | 18 |
| Tabela 2 – Compostos isolados ou derivados de fontes marinhas aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration) ou em fase de testes clínicos..... | 21 |
| Tabela 3 – Frações resultantes do fracionamento cromatográfico do extrato AcOEt bioproduzido pela BRA-342..... | 30 |
| Tabela 4 – Atividade citotóxica dos extratos orgânicos obtidos em cultura de células HCT-116 avaliadas pelo ensaio do MTT após 72hs de incubação. Os valores representam suas respectivas CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) e intervalo de confiança de 95% (IC95%)..... | 39 |
| Tabela 5 – Atividade citotóxica das frações D – G da BRA-342 em cultura de células HCT-116 avaliadas pelo ensaio do MTT após 72hs de incubação. Os valores representam suas CI_{50} e IC95% em $\mu\text{g/mL}$ | 40 |
| Tabela 6 – Atividade citotóxica das frações D e E obtidas a partir do primeiro fracionamento e do extrato bruto da BRA-346 em cultura de células HCT-116 avaliadas pelo ensaio do MTT após 72hs de incubação. Os valores representam suas CI_{50} e IC95% em $\mu\text{g/mL}$ | 41 |
| Tabela 7 – Atividade citotóxica das frações obtidas da partição BRA-346 A em cultura de células HCT-116 avaliadas pelo ensaio do MTT após 72hs de incubação. Os valores representam suas CI_{50} e IC95% em $\mu\text{g/mL}$ | 43 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------------------------------|---|
| AcOEt | Acetato de etila |
| BLAST | <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> |
| B O D | <i>Biochemical Oxygen Demand</i> |
| CCDA | Cromatografia em Camada Delgada Analítica |
| CH ₂ Cl ₂ | Diclorometano |
| CH ₃ CN | Acetonitrila |
| CI ₅₀ | Concentração inibitória média |
| CLAE | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| DMEM | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DOX | Doxorrubicina |
| IC | Intervalo de confiança |
| INCA | Instituto Nacional do Câncer |
| MTT | 3-(4,5dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazólio |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> |
| SCA | <i>Starch casein agar</i> |
| SWA | <i>Seawater agar</i> |
| TMA | <i>Trace mineral agar</i> |

SUMÁRIO

| | | |
|----------------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 14 |
| 1.1 | Câncer | 14 |
| 1.2 | Produtos naturais marinhos | 16 |
| 1.3 | Ascídias e micro-organismos associados | 18 |
| 2 | OBJETIVOS | 22 |
| 2.1 | Objetivo geral | 22 |
| 2.2 | Objetivos específicos | 23 |
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS | 23 |
| 3.1 | Planejamento experimental | 23 |
| 3.2 | Coleta do material | 25 |
| 3.3 | Processamento do material para isolamento de micro-organismos cultiváveis | 26 |
| 3.3.1 | <i>Meios de cultura</i> | 27 |
| 3.4 | Criopreservação dos micro-organismos isolados | 27 |
| 3.5 | Obtenção dos extratos brutos | 28 |
| 3.6 | Avaliação da atividade citotóxica <i>in vitro</i> | 28 |
| 3.7 | Fracionamento químico dos extratos ativos | 29 |
| 3.7.1 | BRA-342 | 30 |
| 3.7.1.1 | <i>Fracionamento cromatográfico do extrato AcOEt produzido pela BRA-342</i> | 30 |
| 3.7.2 | BRA-346 | 31 |
| 3.7.2.1 | <i>Fracionamento cromatográfico do extrato AcOEt produzido pela BRA-346</i> | 31 |
| 3.7.2.2 | <i>Fracionamento cromatográfico da fração BRA-346 A</i> | 32 |
| 3.8 | Identificação molecular | 33 |
| 4 | RESULTADOS | 35 |
| 4.1 | Recuperação de bactérias | 35 |
| 4.2 | Avaliação da atividade citotóxica | 36 |
| 4.2.1 | Avaliação da atividade citotóxica dos extratos brutos | 37 |
| 4.2.1.1 | <i>Avaliação da atividade citotóxica com concentração fixa do extrato bruto</i> | 37 |
| 4.2.1.2 | <i>Concentração inibitória média da proliferação celular dos extratos brutos</i> | 38 |
| 4.2.2 | BRA-342 | 39 |
| 4.2.3 | BRA-346 | 41 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 4.3 | Aspectos morfológicos das linhagens de bactérias produtoras de compostos ativos..... | 44 |
| 4.4 | Identificação molecular..... | 50 |
| 5 | DISCUSSÃO..... | 51 |
| 6 | CONCLUSÃO..... | 56 |
| | REFERÊNCIAS..... | 57 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

Câncer é o nome dado a um conjunto de centenas de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se, formando metástases, para outras regiões do corpo (WHO, do inglês World Health Organization, 2016).

Representando a segunda causa de morte da população mundial, o câncer é um problema de saúde pública, pois somente no ano de 2012 foram registrados 14 milhões de novos casos de câncer e destes, 60% ocorreram em continentes com grande número de países emergentes, como África, Ásia e Américas Central e Sul. Os óbitos devido à doença nesse ano ultrapassaram os oito milhões (WHO, 2014). Somente nos Estados Unidos em 2010 foram gastos 125 bilhões de dólares e estima-se que essa quantia aumentará em 25 bilhões nos próximos quatro anos para cobrir cuidados e tratamentos de pacientes com câncer (NCI, 2016).

No Brasil, cerca de 600 mil casos novos de câncer são esperados para o biênio 2016-2017. A **Figura 1** mostra que os tipos mais incidentes serão os cânceres de pele não melanoma, próstata, pulmão, cólon e reto, estômago e cavidade oral para o sexo masculino; e os cânceres de pele não melanoma, mama, intestino, colo do útero, pulmão e estômago para o sexo feminino (INCA, 2015).

Figura 1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016-2017 por sexo, exceto pele não melanoma

| Homens | | | Mulheres | | |
|-----------------------------|-------------|-------|-----------------------------|-------------|-------|
| Localização primária | casos novos | % | Localização primária | casos novos | % |
| 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 | 7.600 | 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 | 6.360 | 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% |

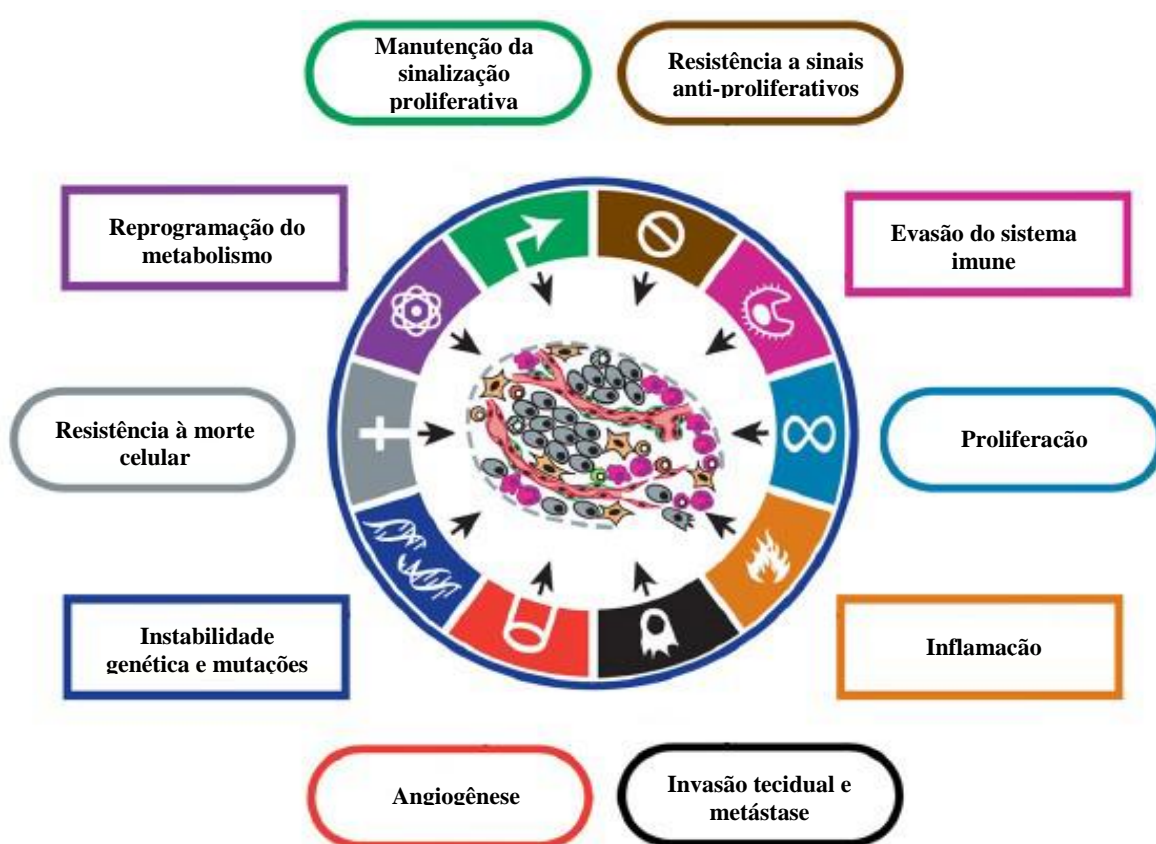
Fonte: INCA, 2015.

Muitos fatores estão envolvidos no desenvolvimento celular desregulados. Os mecanismos que regulam a proliferação celular são de grande valia para a manutenção do crescimento celular normal. Contudo, as células tumorais mostram uma perda no controle dessa proliferação e tornam-se independentes de sinais mitogênicos do tecido normal (HANAHAN; WEINBERG, 2000; LOURO *et al.*, 2002).

A mutação permite um descontrole na proliferação celular e essa instabilidade é um componente chave na origem do tumor uma vez que possibilita a geração de diversidade genética e pode induzir a aquisição de características carcinogênicas. As alterações nos mecanismos de regulação tornam a célula apta a passar pelo ciclo celular sem a devida checagem, permitindo o crescimento desregulado das células, além do acúmulo de uma série de mutações (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Hanahan e Weinberg (2011) elencaram características cruciais das neoplasias identificando sinais de como células normais podem evoluir para o estado neoplásico, e listaram essas aquisições que se apresentam em todos os tipos de câncer (**Figura 2**). Dentre tais sinais presentes nas células neoplásicas têm-se: manutenção da sinalização proliferativa, reprogramação do metabolismo, resistência à morte celular programada, instabilidade genética e mutações, angiogênese, invasão tecidual e metástase, geração de processo inflamatório, proliferação ilimitada, evasão do sistema imune e resistência a sinais anti-proliferativos. Esses sinais envolvem ativação constante de genes que permitem o descontrole do crescimento celular e a inativação dos genes supressores desse crescimento desordenado. O processo inflamatório e o surgimento de novos vasos sanguíneos promovem o aporte de nutrientes para as novas células.

Figura 2 - Principais características de células tumorais



Fonte: Adaptado de Hanahan e Weinberg (2011).

A necessidade de novos fármacos específicos para as células neoplásicas que apresentem toxicidade reduzida e índice terapêutico favorável tem sido um desafio para a indústria farmacêutica, a fim de reduzir os efeitos colaterais resultantes do tratamento com quimioterápicos (ALMEIDA *et al.*, 2005). Diante deste quadro, é importante que mais estratégias terapêuticas que eliminem a massa tumoral e causem menos danos às células normais sejam desenvolvidas (BRANNON-PEPPAS; BLANCHETTE, 2004). Tal situação impulsiona pesquisas que incluem a busca por novos medicamentos antineoplásicos.

1. 2 Produtos naturais marinhos

Os produtos naturais são de grande importância para a humanidade desde a antiguidade. Suas propriedades farmacológicas são utilizadas no tratamento de doenças

(NEWMAN; CRAGG, 2016). Na década de 80, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que mais de 60% da população mundial utilizava os produtos naturais, principalmente os derivados de plantas, para o cuidado da saúde (CRAGG; NEWMAN, 2013).

Diante da necessidade de descoberta de novos fármacos, o ambiente marinho foi sendo mais explorado, dando visibilidade a alguns organismos como esponjas, corais, ascídias, moluscos e briozoários que se destacaram por apresentarem novas moléculas com interesse farmacológico. Vale ressaltar que os produtos naturais marinhos tiveram sua descoberta iniciada com o trabalho de Bergman e Feeney na década de 50, através do isolamento de compostos da esponja marinha *Cryptotethya crypta*, a espongouridina e espongotimidina (BERGMANN; FEENEY, 1951; BERGMANN; BURKE, 1956; FENICAL, 2006; NEWMAN; CRAGG, 2012). A descoberta desses compostos proporcionou o desenvolvimento da Vidarabina (Ara-A) e Citarabina (Ara-C) que são usados na clínica no tratamento de doenças virais e tumores (BERGMANN; STEMPIEN, 1957; PROKSCH *et al.*, 2002).

Apesar do seu potencial biológico, o ecossistema marinho somente despontou na década de 70 em virtude da necessidade de se descobrir novas drogas com potencial farmacológico para o tratamento de doenças. Dentro dessa proposta e devido possibilidade de coleta, os invertebrados marinhos ganharam destaque (PROKSCH *et al.*, 2002).

Nesse contexto, o isolamento do depsipeptídeo cíclico Dideminina B, isolado da ascídia *Trididemnum solidum*, foi a primeira molécula de origem marinha a chegar à fase I de ensaios clínicos para atividade antitumoral (CHUN *et al.*, 1986). Apesar dessa molécula não ter passado da fase II dos ensaios, essa descoberta mostrou o evidente o potencial químico e farmacológico dos mares e oceanos (FENICAL, 1997; POMPONI, 2001; PROKSCH, *et al.*, 2002).

Nos anos que seguiram, o peptídeo analgésico do molusco *Conus magus* teve seu uso aprovado para o tratamento da dor crônica (OLIVEIRA *et al.*, 1985; BLUNT *et al.*, 2012), e também a trabectedina, isolada da ascídia *Ecteinascidia turbinata*, utilizada para o tratamento de câncer de ovário e sarcomas de tecidos moles refratários (RATH *et al.*, 2011; GERWICK e MOORE, 2012). Atualmente, sete compostos de origem marinha ou derivados de protótipos marinhos encontram-se aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o uso clínico (**Tabela 1**).

Tabela 1- Compostos isolados de fontes marinhas aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA)

| Nome | Organismo marinho | Classe química | Atividade biológica |
|--------------------------|-----------------------|------------------------|------------------------------|
| Ácido ômega-3 | Peixe | Ácido graxo ômega-3 | Anti- hipertriglicemiante |
| Brentuximab vedotina | Molusco/cianobactéria | Anticorpo conjugado | Antitumoral |
| Citarabina | Esponja | Nucleosídeo | Antitumoral |
| Mesilato de eribulina | Esponja | Macrolídeo | Antitumoral |
| Trabectedina | Tunicado | Alcalóide | Antitumoral |
| Vidarabina | Esponja | Nucleosídeo | Antiviral |
| Ziconotídeo | Molusco | Peptídeo | Tratamento da Dor |

Fonte: Adaptado de Gerwick & Moore, 2011; Mayer *et al.*, 2010; Marine Pharmacology, 2016.

1.3 Ascídias e micro-organismos associados

As ascídias são organismos dominantes em muitas comunidades marinhas, tendo uma ampla distribuição geográfica (SEED & O'CONNOR, 1981; SCHMIDT & WARNER, 1984; TODD & TURNER, 1988). São animais delicados e quase nunca tolerantes à dessecação na zona entremarés. A Classe Ascidiacea pertence a Subfilo Urochordata. Essa Classe representa o mais numeroso grupo de cordados inferiores, sendo animais exclusivamente marinhos e, em sua maioria, sésseis, fixados a substratos rígidos (RODRIGUES *et al.*, 1998). Pesquisadores acreditam que a ampla distribuição geográfica esteja atrelada ao seu sucesso ecológico, relacionando-o com a síntese de compostos úteis ao seu processo de defesa contra predadores. Tais compostos, componentes de defesa, provém de rotas produtoras de metabólitos secundários (JIMENEZ *et al.*, 2003), compondo, juntamente com esponjas, moluscos, cnidários e algas, o grupo de representantes marinhos quimicamente mais prolíficos (HUNT & VICENT, 2006).

Em 2003, um trabalho desenvolvido por Jimenez e colaboradores utilizou-se de 10 espécies de ascídias abundantes no litoral cearense para verificação da atividade citotóxica de seus extratos hidroalcoólicos. Seis espécies de ascídias apresentaram extratos com atividade biológica em pelo menos um dos testes empregados e a *Euherdmania* sp. e a *Eudistoma vannamei* destacaram-se pela potência dos seus extratos. Os extratos obtidos das ascídia *Eudistoma vannamei* e *Euherdmania* sp. apresentaram citotoxicidade em quatro linhagens de células de câncer – CEM (leucemia humana), HL-60 (leucemia humana), B-16 (melanoma de murinho), HCT-8 (câncer de cólon humano), apresentando valores de CI_{50} entre 2 e 24.3 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, para linhagem CEM. Este foi o primeiro relato de atividade citotóxica para o gênero *Euherdmania*. Contudo, ainda não se tem um estudo aprofundado sobre quais substâncias estão envolvidas na toxicidade (JIMENEZ *et al.*, 2003).

Apesar dos bons resultados, há uma dificuldade em recuperar grande quantidade de extratos para estudos pré-clínicos e clínicos, sendo, portanto, um entrave importante na área de produtos naturais marinhos. Para superar esse problema, diferentes técnicas têm sido desenvolvidas como aquicultura, síntese e mais recentemente, o cultivo dos micro-organismos associados aos animais marinhos (JENSEN & FENICAL, 2000). O potencial dos micro-organismos marinhos na busca de novos fármacos também é fundamentado na importância histórica dos micro-organismos terrestres como fonte de fármacos. De fato, esforços vêm sendo dedicados neste sentido e inúmeros metabólitos secundários interessantes já foram isolados a partir desses grupos (WILLIAMS, 2009).

Os micro-organismos podem viver em associação com animais, inclusive com os marinhos, que podem abrigar diversas espécies de bactérias. Sabe-se que o organismo proporciona um ambiente estável o qual possibilita condições viáveis para o desenvolvimento dos micro-organismos, proporcionado um ambiente que resulta em associações específicas para cada espécie (MUSCHOLL-SILBERHORN *et al.*, 2008; PENESYAN *et al.*, 2010).

A relação estabelecida entre o micro-organismo e o hospedeiro é tão próxima que, muitas vezes, dificulta a identificação imediata do real produtor de determinados compostos encontrados.

A importância dos micro-organismos para o desenvolvimento de compostos foi intensificada a partir da necessidade de se obter suprimento adequado das substâncias em

testes pré-clínicos e clínicos. Dentro dessa problemática, os micro-organismos cultiváveis surgem como solução sustentável para produção de compostos bioativos.

Acredita-se num amplo potencial do ambiente marinho, pois a estimativa é que possa ser encontrado de 10^6 micro-organismos marinhos por milímetro de água do mar (FENICAL & JENSEN, 1993). Estudos apontam que tais micro-organismos podem produzir diversificado arsenal metabólico por estarem submetidos a fortes pressões, alta salinidade e relação ecológicas diferenciadas de sobrevivência (WARD & BORA, 2006). Contudo, a produção desses metabólitos pode sofrer influencia de variações de temperatura, concentração de gases e disponibilidade de nutrientes, principalmente carbono e nitrogênio (OMURA *et al.*, 1977).

Os micro-organismos marinhos desenvolveram um aparato metabólico bastante peculiar, pois estão constantemente submetidos ao alto teor de salinidade, alta pressão e relações simbióticas complexas. Isso, decerto modo, muito mais promíscuo que o de seres multicelulares. Essa característica lhes confere uma enorme capacidade adaptativa o que garantiu a sua sobrevivência em ambientes às vezes extremos, e favoreceu a produção de metabólitos nunca antes observados para organismos terrestres (ZHANG *et al.*, 2005; WARD & BORA, 2006; LIU *et al.*, 2008).

A maioria dos invertebrados não exhibe um padrão característico de metabólitos, uma vez que estes são quase que exclusivamente, elaborados por micro-organismos a eles associados ou são obtidos de dietas alimentares. Portanto, admite-se que a capacidade de biossintetizar uma grande diversidade de metabólitos resultantes de vias biogénicas tão distintas não é uma característica intrínseca de animais como esponjas, cnidários ou ascídias, mas sim uma atividade própria de micro-organismos a eles associados (PEREIRA *et al.*, 2009).

Estudos demonstraram que alguns compostos isolados a priori de invertebrados marinhos são, na verdade, sintetizados por bactérias (MOHAPATRA *et al.*, 2002). Como forte exemplo, temos a briostatina, que é um policetídeo em fase de testes clínicos, recuperado do briozoário *Bugula neritina*. Contudo, uma investigação mais aprofundada, nível molecular, aponta que a bactéria simbiote, *Candidatus Endobugula sertula*, produz as briostatinas (DAVIDSON *et al.*, 2001).

Uma bactéria associada à esponja marinha *Dysidea avara*, coletada no Mar Adriático, foi detectada como produtora do composto 2-metil-tio-1,4-naftoquinona, que apresenta propriedade antiangiogênica e antimicrobiana (THAKUR *et al.*, 2005).

Considerando os fortes indícios de que os micro-organismos associados sejam os verdadeiros responsáveis por boa parte do elaborado arsenal de metabólitos secundários isolados de invertebrados marinhos, uma atrativa solução para a prospecção racional dos recursos do mar é fornecer a esses simbioses meios de cultivo apropriados, para um suficiente fornecimento desses metabólitos, por meio da fermentação biológica de microrganismos marinhos.

Grande parte dos micro-organismos produtores de compostos bioativos é da classe dos actinomicetos. Essas bactérias são gram-positivas e compõem um grande grupo de micro-organismos presente no ambiente terrestre e marinho. Estima-se que cerca de 50% dos antibióticos naturais sejam produzidos por actinomicetos (RAVIKUMAR *et al.*, 2012). Dentre as ações farmacológicas dos metabólitos secundários extraídos de micro-organismos marinhos têm-se atividade antibiótica, antitumoral, antidiabética, antimalárica, antiparasitária, anti-inflamatória, anticoagulante, antiviral e antituberculósica (EL SAYED *et al.*, 2000; KAISER *et al.*, 2002; MAYER *et al.*, 2010; WATERS *et al.*, 2010) (**Tabela 2**). Dentre os fármacos produzidos por actinomicetos marinhos, merece destaque a salinosporamida A, composto com potente atividade citotóxica que já se encontra na fase I dos testes clínicos, isolado da bactéria *Salinispora tropica* (FENICAL & JENSEN, 2006)

Tabela 2 - Compostos isolados ou derivados de fontes marinhas aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration, EUA) ou em fase de testes clínicos

| Composto | Micro-organismo | Atividade biológica |
|--------------|-----------------|---------------------|
| Abissomicina | Actinomiceto | Antibiótico |
| Apratoxina A | Cianobactéria | Antitumoral |
| Apratoxina D | Cianobactéria | Antitumoral |
| Briostatina | Proteobactéria | Antitumoral |
| Coibamida A | Cianobactéria | Antitumoral |

| | | |
|-------------------|---------------|-------------|
| Criptoficina | Cianobactéria | Antitumoral |
| Curacina A | Cianobactéria | Antitumoral |
| Largazola | Cianobactéria | Antitumoral |
| Marinomicinas | Actinomiceto | Antibiótico |
| Proximicina | Actinomiceto | Antitumoral |
| Salinosporamida A | Actinomiceto | Antitumoral |
| SS-228 Y | Actinomiceto | Antibiótico |
| Tiocoralina | Actinomiceto | Antitumoral |

Fonte: Adaptado de Williams, 2008; Imhoff *et al*, 2011.

Diante da importante produção de metabólitos secundários com atividade biológica a partir do ambiente marinho e da necessidade do desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento do câncer e suas complexidades, é altamente relevante o estudo de micro-organismos associados às ascídias *Eudistoma vannamei* e *Euherdmania* sp., se considerando que a nossa rica biodiversidade marinha local ainda é pouco explorada e o grande potencial farmacológico dos micro-organismos marinhos. Juntamente, também é estratégico por explorar a nossa biodiversidade de forma sustentável, uma vez que visamos o isolamento de micro-organismos cultiváveis em laboratório. Ao mesmo tempo contribuimos para a ampliação do conhecimento da nossa biodiversidade e dos produtos naturais com potencial farmacológico.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Prospecção de substâncias com potencial antitumoral obtidas de bactérias associadas às ascídias *Eudistoma vannamei* e *Euherdmania* sp.

2.2 Objetivos específicos

- ❖ Isolar colônias de bactérias cultiváveis associadas às ascídias *E. vannamei* e *Euherdmania* sp. para compor o banco de micro-organismos do laboratório;
- ❖ Avaliar a citotoxicidade em células tumorais, *in vitro*, dos extratos orgânicos das bactérias isoladas;
- ❖ Realizar fracionamento guiado pela atividade citotóxica dos extratos mais ativos;
- ❖ Identificar os compostos presentes nas frações ativas;
- ❖ Identificar as linhagens bacterianas produtoras de compostos ativos;

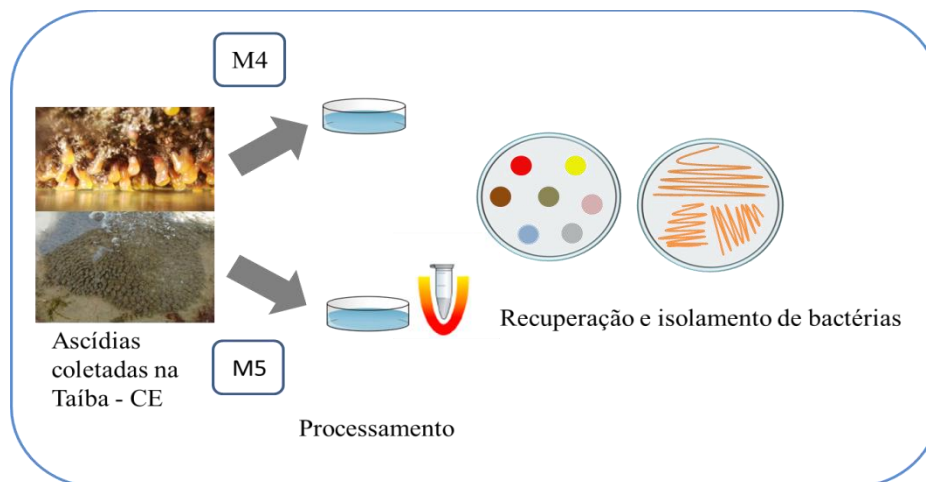
3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Planejamento experimental

O planejamento experimental para este trabalho (**Figura 3**) consistiu inicialmente no processamento das ascídias, que levou a recuperação de bactérias associadas. As linhagens isoladas foram crescidas em caldo nutritivo para extração dos metabólitos secundários. Os extratos orgânicos foram então testados em células tumorais para identificação da atividade citotóxica. Finalmente, os extratos mais ativos foram selecionados para purificação e identificação dos compostos ativos através de fracionamento guiado pela atividade antiproliferativa aliado a técnicas de Química. Algumas linhagens bacterianas produtoras de extratos citotóxicos foram identificadas.

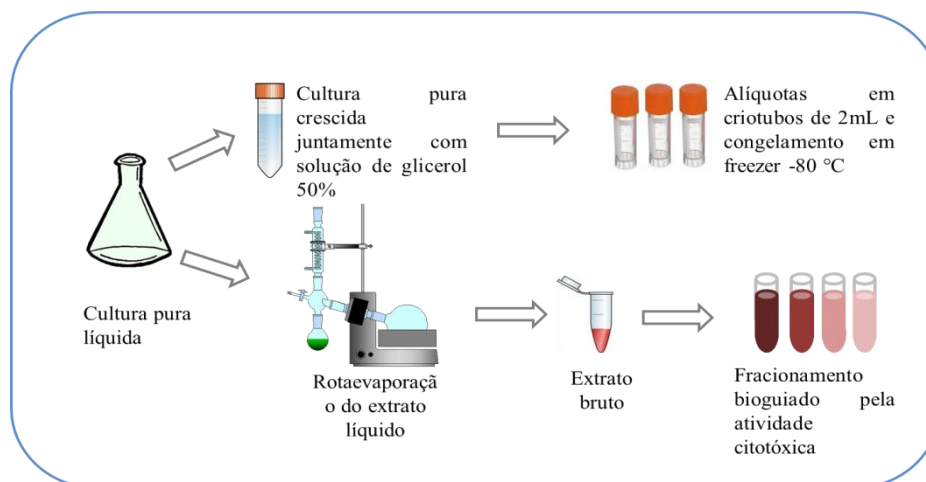
Figura 3 - Planejamento experimental do presente estudo, mostrando as etapas em sequência de recuperação das bactérias associadas, crescimento e criopreservação dessas bactérias, obtenção dos extratos brutos e seu fracionamento, ensaio de avaliação da atividade citotóxica e identificação molecular das cepas

1 - Coleta das ascídias e isolamento dos micro-organismos



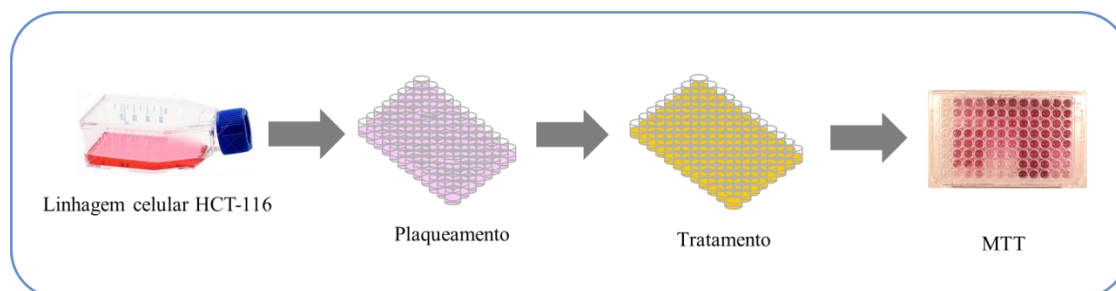
Fonte: Elaborado pela autora.

2 - Criopreservação das cepas e preparação dos extratos brutos



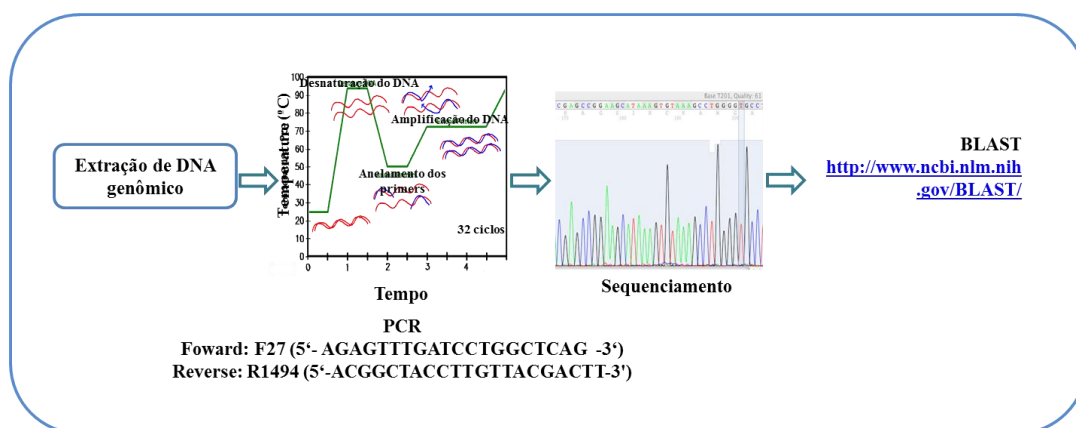
Fonte: Elaborado pela autora.

3 - Avaliação da citotoxicidade



Fonte: Elaborado pela autora.

4 - Identificação taxonômica das cepas selecionadas



Fonte: Elaborado pela autora.

3.2 Coleta do material

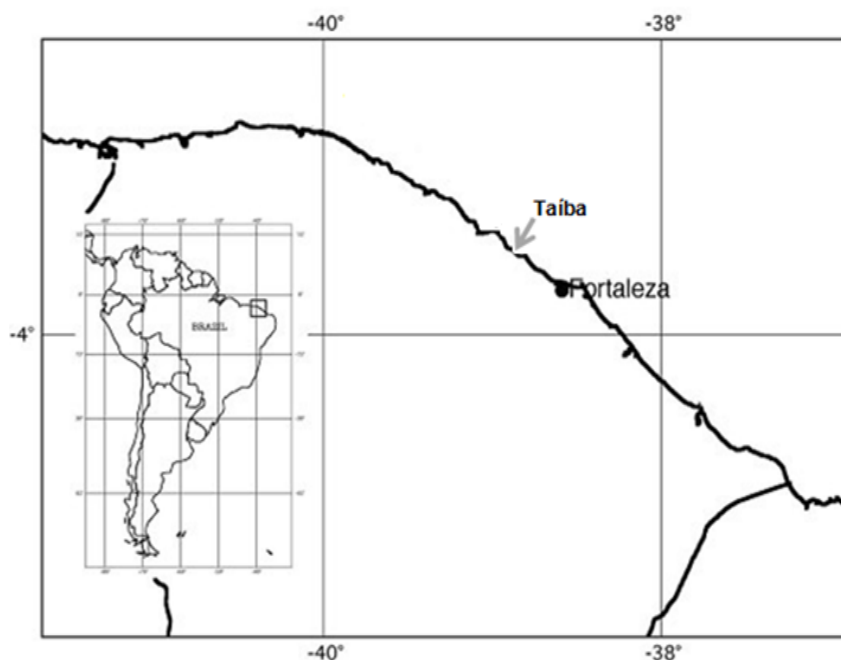
As ascídias (**Figura 4**) foram coletadas na praia da Taíba, município de São Gonçalo do Amarante, Ceará, sendo o ponto de coleta delimitado pelas seguintes coordenadas 3°34,125'S; 38°54,469'W (**Figura 5**). Após a coleta, as amostras foram lavadas com água estéril, borrifadas com álcool 70% (v/v) para retirada de contaminantes, guardadas em sacos plásticos estéreis e estocadas em freezer -70 °C (MDF-U54VC, Sanyo).

Figura 4 - Ascídias coletadas na praia da Taíba. *Eudistoma vannamei* e *Euherdmania* sp., respectivamente



Fonte: Fotografias feitas por Diego Wilke e Luciana Furtado

Figura 5 - Mapa indicando o local de coleta das ascídias, praia da Taíba-CE.



3.3 Processamento do material para isolamento de micro-organismos cultiváveis

As ascídias foram processadas no Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia Marinha (LaBBMar) do Núcleo de Pesquisas e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará. Dentro de uma câmara de fluxo unidirecional (Filtracom Mini Flow I), as ascídias foram trituradas com tesoura e pinça cirúrgicas estéreis até formarem uma pasta densa. Acrescentou-se a essa pasta 500 μL de água do mar estéril. Utilizou-se dois métodos de recuperação de micro-organismos, trituração (M4) e trituração juntamente com aquecimento a 55 °C por 10 minutos (M5).

Para o primeiro método (M4), da amostra triturada, juntamente com a água do mar, foi retirada uma alíquota de 100 μL e depositada em cada uma das placas de meio seletivo para estriamento com alça estéril. Já para o segundo método, alíquotas de 100 μL foram estriadas nas placas que continham meio seletivos. Todas as amostras foram incubadas em placas de ágar contendo meios favoráveis ao crescimento de actinomicetos (SCA, SWA e TM, descritos abaixo). As placas seguiram para incubadora B.O.D (CIENTEC, modelo CT-708) a 28 °C, permanecendo por um período de 30 a 90 dias. Após uma semana já foi possível selecionar colônias de bactérias nas placas. Para o isolamento das bactérias selecionadas, estas foram transferidas para placas de Petri com meio A1 sólido, utilizando-se palito de madeira fino e alças de cultivo de micro-organismos.

3.3.1 Meios de cultura:

SCA (*Starch Casein Agar*): 63g do meio pronto e desidratado (HiMEDIA Laboratories); 1 L de água do mar filtrada e diluída a 75% em H₂O destilada (dH₂O).

SWA (*Sea Water Agar*): 18g de ágar; 1L de água do mar filtrada e diluída a 75% em dH₂O.

TMA (*Trace Mineral Agar*): 0,1g de glicose; 0,1g de extrato de levedura; 0,5g de K₂HPO₄; 0,7g de Na₂HPO₄; 0,1g de KNO₃; 0,3g de NaCl; 0,1g de MgSO₄.7H₂O; 0,02g de CaCl₂.2H₂O; 18g de ágar; 1 L de água do mar diluída a 75% em dH₂O.

A1 sólido: 10g de amido solúvel; 4g de extrato de levedura; 2g de peptona; 18g de ágar; 1 L de água do mar filtrada diluída a 75% em dH₂O.

A1 líquido: 10g de amido solúvel; 4g de extrato de levedura; 2g de peptona; 1 L de água do mar filtrada diluída a 75% em dH₂O.

Todos os meios foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 30 minutos e aos seletivos, SWA, ATM e SCA, foi acrescentado o antifúngico ciclo-hexamida a uma concentração de 100 µg/mL.

3.4 Criopreservação dos micro-organismos isolados

Todas as bactérias recuperadas foram criopreservadas e catalogadas num total de 9 criotubos para cada cepa, contendo volume de 1,5 mL do preparado para cada cepa. Cada micro-organismo isolado das ascídias foi preservado a -70 °C, utilizando como agente protetor solução de glicerol 50% (v/v). Retirou-se 10 mL da cultura líquida, crescida há sete dias, e adicionou-se, em tubo falcon estéril, 10 mL de solução de glicerol 50% (v/v), previamente preparada com glicerina (Dinâmica) e água destilada. Em seguida, o preparado foi aliqotado em criotubos de 2 mL e, então, estocados em freezer -70 °C. A partir daí, a cepa passou a integrar o inventário de micro-organismos do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia Marinha, recebendo um código composto das letras BRA e numeração subsequente, BRA – XXX.

3.5 Obtenção dos extratos brutos

As bactérias isoladas foram inoculadas em Erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL de meio A1 líquido e mantidas sob agitação orbital (150RPM) (TECNAL, TE-245), 26 °C por sete dias. Passado esse período, realizou-se a extração dos metabólitos secundários adicionando acetato de etila (AcOEt) na proporção 1:1, por uma hora de agitação (80 RPM). Após a separação da biomassa em funil de separação, recuperou-se a partição líquida que continha o solvente e os metabólitos e adicionou-se a esta sulfato de sódio anidro para retirada de água desta solução. Posteriormente, as amostras foram secas por destilação a pressão reduzida em rota-evaporador a uma temperatura entre 30°C e 35°C para obtenção do extrato bruto. A biomassa foi descartada. As amostras foram transferidas para pequenos frascos com o auxílio de diclorometano e, então, deixadas para secar a temperatura ambiente.

Os extratos brutos com menor concentração inibitória média, BRA-342 e BRA-346, tiveram suas cepas selecionadas para crescimento em larga escala.

3.6 Avaliação da atividade citotóxica *in vitro*

Os extratos foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) e tiveram sua atividade citotóxica avaliada em células tumorais por meio do ensaio do MTT, um método que quantifica indiretamente a viabilidade celular, por meio da enzima succinil-desidrogenase presente nas mitocôndrias. Essa enzima faz a conversão do sal amarelo 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazólio (MTT) em um precipitado de coloração roxa, formazan, (MOSMANN, 1983).

Para o ensaio foi utilizada a linhagem celular de carcinoma colorretal, HCT-116, adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), que foi cultivada em garrafas plásticas próprias para a cultura celular (Corning, 25 cm², volume de 50 mL ou 75 cm², volume de 250 mL), utilizando meio de cultura DMEM, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 2% de antibióticos (100UI penicilina/ 100 µg/mL estreptomicina). As células foram mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade.

Para o ensaio do MTT as células foram plaqueadas em placas de 96 poços na concentração de $5,0 \times 10^4$ céls/mL, em seguida foram tratadas por 72 horas, em duplicata, com os extratos e frações a uma concentração estoque de 10 mg/mL. Para selecionar amostras ativas, estas foram diluídas em DMSO e testadas em dose única de 50 µg/mL. Para aqueles ativos, que apresentaram inibição maior ou igual que 75%, realizou-se novo ensaio avaliando citotoxicidade em concentrações que variaram de 0,0032 a 50 µg/mL.. Como controle positivo, utilizou-se o quimioterápico doxorrubicina, potente inibidor de crescimento celular. Passadas 72 h após o início do tratamento, aspirou-se o sobrenadante de cada poço e adicionou-se 150 µL da solução de MTT, (Sigma) em meio DMEM (0,5 mg/mL), sendo a placa colocada novamente na estufa por 3 h. Em seguida, o sobrenadante foi novamente aspirado e seu precipitado ressuspensionado em 150 µL de DMSO. As placas foram lidas em leitora de placas (Fisher Scientific, modelo Multiskan FC) no comprimento de onda de 595 nm.

Os experimentos foram realizados pelo menos 2 vezes em duplicata e analisados através de suas médias e valores de erro-padrão da média. A análise da triagem inicial em concentração única foi realizada normalizando dos valores de absorbância, relativas ao controle e transformando os valores em percentagem de inibição do crescimento. O cálculo da concentração inibitória média (CI_{50}) e dos respectivos intervalos de confiança (IC 95%) foi realizado a partir da regressão não-linear dos dados normalizados. Todos os resultados foram analisados utilizando-se o programa GraphPad Prism (GraphPad Software versão 5.0).

3.7 Fracionamento químico de extratos ativos

Os fracionamentos químicos foram feitos em parceria com a Profa. Dra. Otilia Pessoa e seus colaboradores Dra. Maria da Conceição de Menezes Torres e MSc. Francisco das Chagas Lima Pinto no Laboratório de Análise Fitoquímica de Plantas Medicinais (LAFIPLAM II) da Universidade Federal do Ceará. Todas as frações obtidas foram testadas no ensaio do MTT para guiar a purificação dos compostos ativos pela atividade biológica.

3.7.1 BRA-342

O crescimento em maior quantidade da cepa BRA-342 foi realizado no Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia Marinha (LaBBMar) e consistiu de quatro frascos de Erlenmeyers de 2L, para os quais uma alíquota de 50 mL da cultura da bactéria foi adicionada a um volume de 500 mL de meio A1, gerando um total de 2,2L de cultura bacteriana. O cultivo durou sete dias em temperatura de 26 °C e sob agitação (130 RPM). Após esse período, o fermentado biológico foi extraído com AcOEt a uma agitação de 80 RPM por 1 hora e em seguida submetido a uma separação líquido-líquido em funil de separação. A solução resultante foi tratada com Na₂SO₄, e o solvente seco por destilação a pressão reduzida para obtenção do extrato bruto AcOEt (108,2 mg).

3.7.1.1 Fracionamento cromatográfico do extrato AcOEt produzido pela BRA-342

O fracionamento cromatográfico deste extrato, em coluna a vácuo, usando gel sílica comum recuperada (126 mg) como fase estacionária e os solventes Hexano, AcOEt e MeOH, puros ou em mistura binária com ordem crescente de polaridade como eluente, forneceu 7 frações (**Tabela 3**).

Tabela 3 - Frações resultantes do fracionamento cromatográfico do extrato AcOEt bioproduzido pela BRA-342

| Eluente | Volume (mL) | Fração | Massa (mg) |
|------------------|-------------|--------|--------------|
| Hexano | 50 | A | 10,2 |
| Hexano/AcOEt 10% | 50 | B | 17,1 |
| Hexano/AcOEt 20% | 100 | C | 41,7 |
| Hexano/AcOEt 30% | 50 | D | 2,0 |
| Hexano/AcOEt 50% | 100 | E | 8,5 |
| AcOEt | 50 | F | 3,4 |
| MeOH | 50 | G | 22,2 |
| TOTAL | | | 107,4 |

Fonte: Elaborada por Maria da Conceição de Menezes Torres.

A análise por Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) das frações A-G, utilizando soluções de vanilina, Erlich e ninidrina como reveladores, mostrou que as

frações D e E tinham um perfil químico semelhante e, por isso, foram reunidas (10,5 mg) e, em seguida, todas as frações resultantes foram submetidas a análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em coluna de fase analítica (C18; 5 µm; 4,6 x 250 mm). Como eluente foi utilizado um gradiente linear binário composto de CH₃CN/H₂O 0,1% TFA, variando a concentração de CH₃CN de 5-95% em 30 min., seguido de lavagem da coluna com CH₃CN 100% por 10 min e CH₃CN 5% por 8 min. Tais métodos possibilitaram isolar prodigiosina, um composto já conhecido por sua atividade citotóxica, presente nas frações D e E.

3.7.2 BRA-346

O crescimento em larga escala da cepa BRA-346 foi realizado em 4 frascos de Erlenmeyers de 2L, onde uma alíquota de 50 mL da cultura de bactérias foi adicionada a um volume de 500 mL de meio A1. As cepas foram crescidas em 2,2L de meio de cultura, cultivadas durante um período de sete dias. Todas as cepas foram crescidas em temperaturas de 25-28 °C e sob agitação de 270 RPM. Após esse período, o fermentado biológico foi extraído com AcOEt sob agitação de 140 RPM por 1 hora, em seguida submetido a uma separação líquido-líquido em funil de separação. A solução resultante foi tratada com Na₂SO₄, e o solventes seco por destilação a pressão reduzida para obtenção do extrato bruto AcOEt (135 mg).

3.7.2.1 Fracionamento cromatográfico do extrato AcOEt produzido pela BRA-346

Inicialmente, para o fracionamento do extrato bruto AcOEt da BRA-346 utilizou-se coluna a vácuo de gel sílica, como fase estacionária, e os solventes Hexano, AcOEt e MeOH, puros ou em mistura binária com ordem crescente de polaridade, como eluentes. A partir desse fracionamento, obteve-se sete frações (A-G).

Estas frações foram testadas por meio do ensaio do MTT e a partir dos valores de CI₅₀, selecionou-se as frações D e E, mais ativas, para monitoramento por CLAE e LC/MS. A análise em CLAE realizou-se 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 5µm). 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 comprimento de onda de 210-400nm.

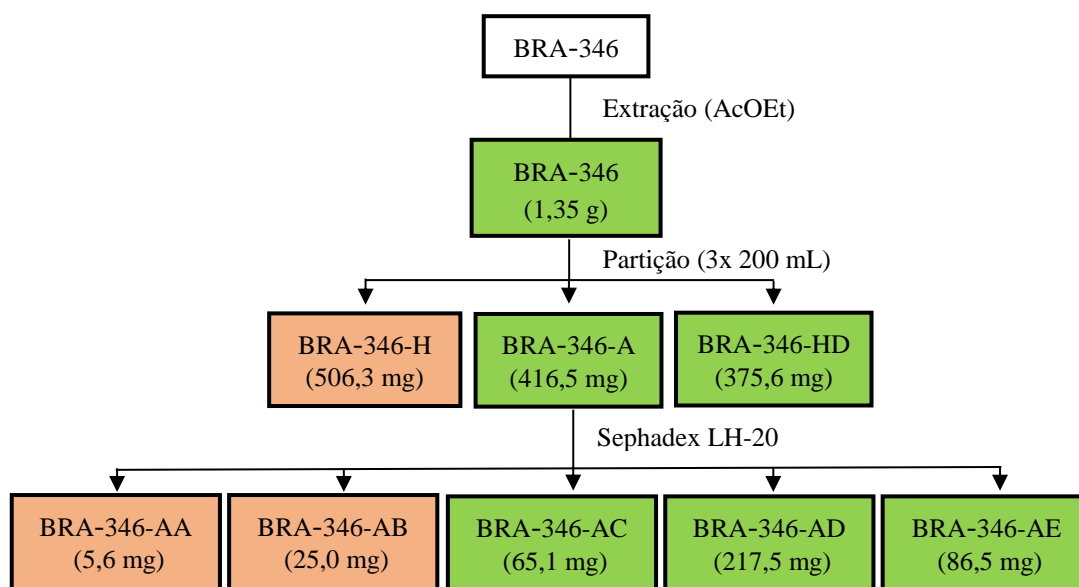
As análises das frações D e E e do extrato bruto da BRA-346 por LC/MS foram realizadas em parceria com o Prof. Dr. Kirley Canuto no Laboratório de Produtos Naturais da Embrapa Agroindústria Tropical. Foi utilizado equipamento UPLC-QTOF usando coluna BEH de 15 cm e fase móvel composta por um gradiente 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.

Os cromatogramas e espectros do extrato bruto e das frações D e E obtidas a partir do fracionamento em gel de sílica sugerem a presença de diferentes classes de compostos reconhecidamente citotóxicos como dicetopiperazinas, piericidinas e lipopeptídeos as quais devem estar envolvidas na atividade citotóxica.

Na tentativa de compreender melhor a atividade citotóxica do extrato frente as suas frações, realizou-se novo crescimento da BRA-346. O extrato (1,3 g) foi dissolvido em 100 mL de uma solução composta por MeOH/H₂O 8:2 (v/v) e particionada com n-hexano e AcOEt (2x 100 mL), as quais foram tratadas com Na₂SO₄, e o solventes secos por destilação a pressão reduzida e, posteriormente, por fluxo de ar comprimido, fornecendo suas respectivas frações. A mistura hidroalcóolica foi seca por destilação do solvente a pressão reduzida e, posteriormente, foi liofilizada resultando na fração hidroalcóolica.

3.7.2.2 Fracionamento cromatográfico fração BRA-346-A

A fração BRA-346-A (400,5 mg) foi submetida a fracionamento por exclusão molecular em Sephadex LH-20, utilizando como eluente uma mistura de MeOH/CH₂Cl₂ 8:2 em coluna de 3 cm de diâmetro por 50 cm de altura, fornecendo 20 frações de aproximadamente 10 mL cada, as quais foram monitoradas por CCDA, utilizando solução de vanilina, Erlich e ninidrina como reveladores, cujos resultados preliminares permitiram reunir em cinco grupos de frações. A **Figura 6** mostra o fracionamento por exclusão molecular do extrato AcOEt da BRA-346.

Figura 6 - Fluxograma de fracionamento por exclusão molecular do extrato AcOEt da BRA-346**LEGENDA:**Frações com CI_{50} acima de 12 $\mu\text{g/mL}$ Extrato e Frações com CI_{50} abaixo de 0,65 $\mu\text{g/mL}$

Fonte: Elaborado por Francisco das Chagas Lima Pinto

3.8 Identificação Molecular

Parte das bactérias ativas, BRA-339, BRA-342, BRA-346, BRA-347, BRA-386 e BRA-401, foram escolhidas para estudo filogenético, através da região 16S do rDNA e analisadas através do banco e dados BLAST – NCBI (do inglês, *Basic Local Alignment Search Tool*).

A extração do DNA genômico das bactérias foi realizada utilizando o método de extração CTAB. As amostras das cepas foram obtidas a partir de cultura pura das bactérias. Uma alíquota do caldo fermentado foi centrifugada durante 1 minuto a 5.000 RPM a temperatura ambiente para a obtenção do *pellet*. Após a obtenção deste, o sobrenadante foi descartado e adicionado 500 μL do tampão de lise CTAB (2% CTAB, 1,4 M NaCl, 100 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 8,0) + 5 μg 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 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 10 minutos no banho seco a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nessa etapa, o tubo foi homogeneizado por inversão manual.

Após a homogeneização, foi adicionado 500 µL 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, ressuspensionado em 30 µL de TE (10 mM: 1mM, pH 8,0) e mantido no freezer a -70 °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™ 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 destas 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 *et al.*, 2016). O suporte dos ramos foi feito a partir de 1000 réplicas de *bootstrap*.

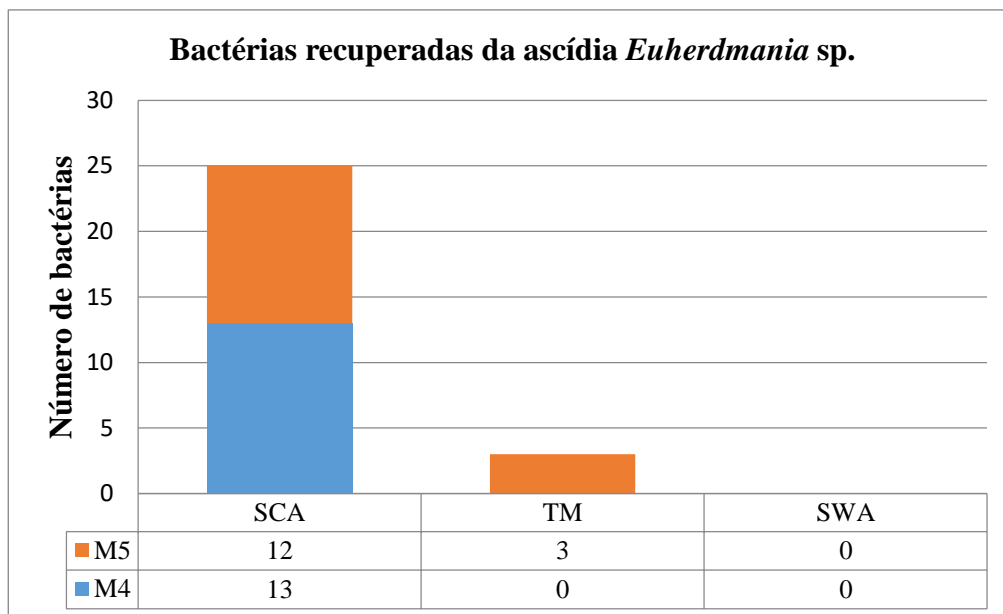
4 RESULTADOS

4.1 Recuperação de bactérias

Foi recuperado das duas amostras de ascídias coletadas na praia da Taíba um total de 36 bactérias, sendo 28 associadas à *Euherdmania* sp. e 8 à *Eudistoma vannamei*, por meio de dois métodos e três diferentes meios seletivos para recuperação de actinomicetos. Todas as bactérias recuperadas foram catalogadas no inventário de micro-organismos do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia Marinha.

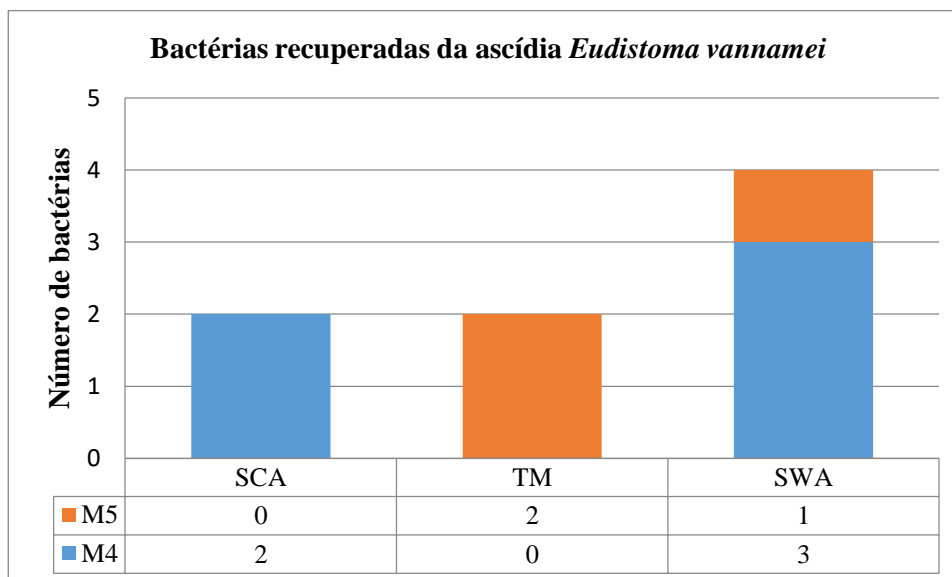
Comparando-se os dois métodos utilizados para recuperação das cepas, observou-se que, na ascídia *Euherdmania* sp., os métodos aplicados no meio SCA não interferiram na quantidade de cepas recuperada. Contudo, vale salientar que esse meio foi mais efetivo, apresentando um total 89% do total de bactérias recuperadas somente dessa ascídia. Para a ascídia *Eudistoma vannamei*, a melhor recuperação ocorreu através do método M4 e meio SWA, representando 38% das bactérias recuperadas dessa ascídia (Gráficos 1 e 2).

Gráfico 1 - Número de colônias isoladas a partir da ascídia *Euherdmania* sp., utilizando os diferentes métodos e meios seletivos



Fonte: Elaborado pela autora.

Gráfico 2 - Número de colônias isoladas a partir da ascídia *Eudistoma vannamei*, utilizando os diferentes métodos e meios seletivos



Fonte: elaborado pela autora.

4.2 Avaliação da atividade citotóxica

4.2.1 Avaliação da atividade citotóxica dos extratos brutos

4.2.1.1 Avaliação da atividade citotóxica com concentração fixa do extrato bruto

Todas as 36 cepas foram crescidas em pequena escala e tiveram a atividade citotóxica de seus extratos orgânicos testada em linhagem de adenocarcinoma colorretal humano, HCT-116. Desses 36 extratos, 19 apresentaram atividade citotóxica significativa com inibição de, no mínimo, 75% da proliferação celular (**Gráficos 3 e 4**).

Gráfico 3 - Valores da porcentagem de inibição da proliferação celular dos extratos das bactérias isoladas da ascídia *Euherdmania* sp. na concentração de 50 µg/mL

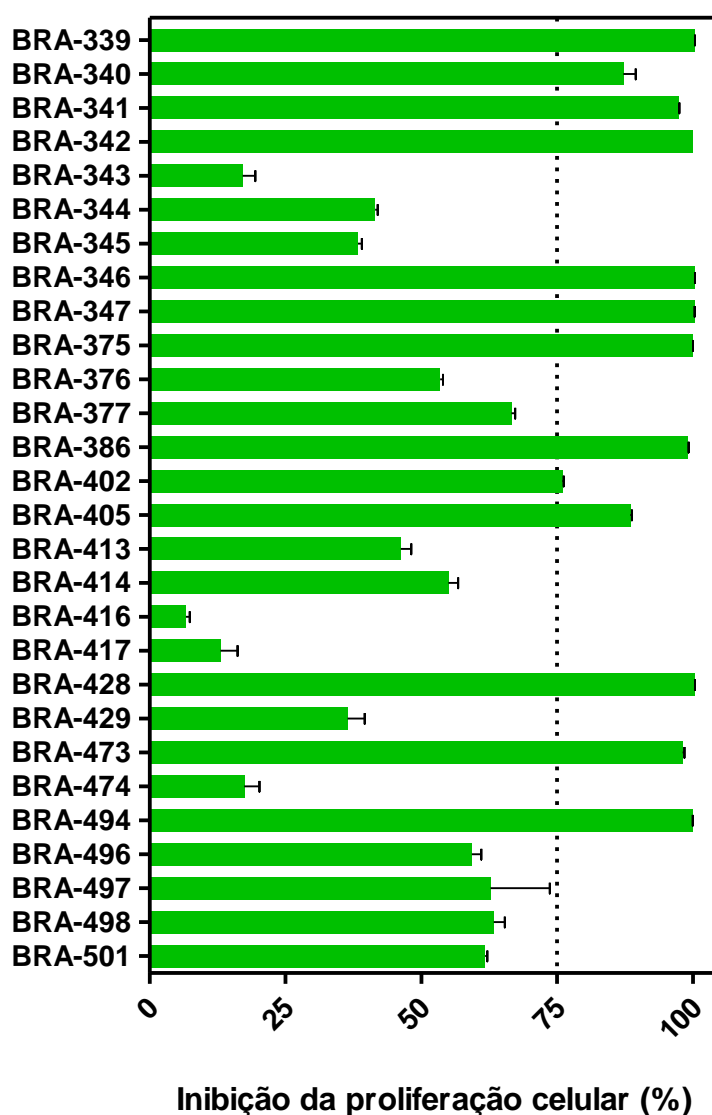
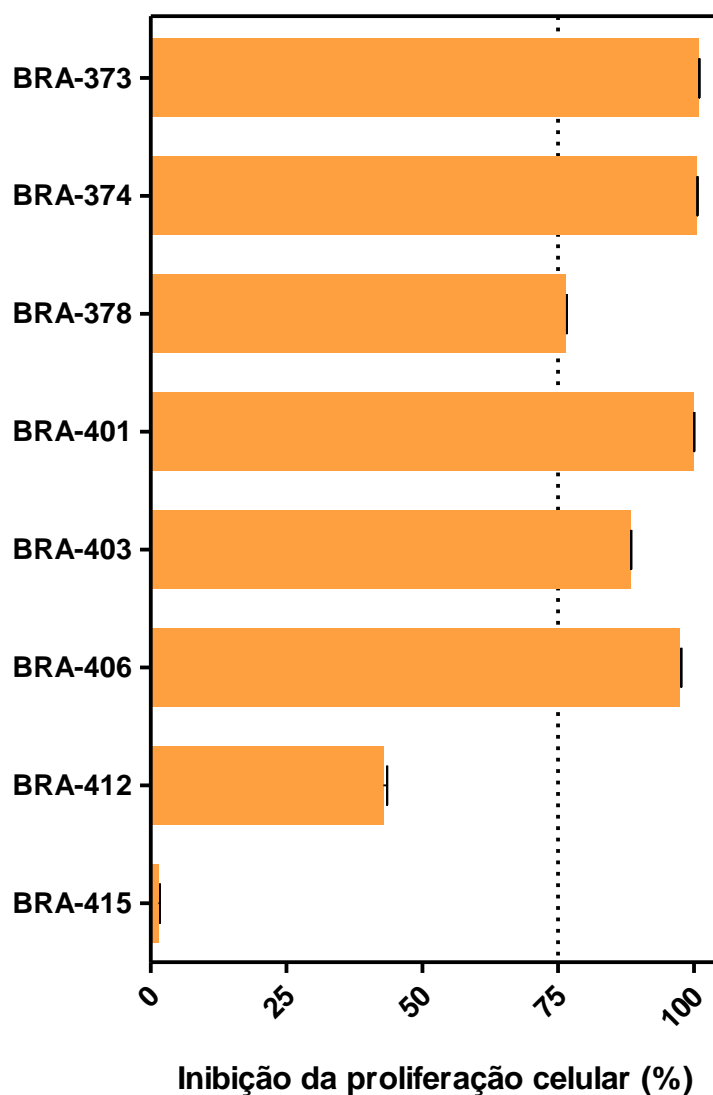


Gráfico 4 - Valores da porcentagem de inibição da proliferação celular dos extratos das bactérias isoladas da ascídia *Eudistoma vannamei* na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$



Fonte: Elaborado pela autora.

4.2.1.2 Concentração inibitória média da proliferação celular dos extratos brutos

Os extratos que testados em concentração fixa de 50 $\mu\text{g/mL}$ inibiram mais 75% da proliferação celular foram selecionados para análise quantitativa da concentração inibitória média, CI_{50} , frente à linhagem tumoral HCT-116 em concentrações que variaram de 0,0032 a 50 $\mu\text{g/mL}$. Os valores de CI_{50} encontram-se na **Tabela 4**.

Tabela 4 - Atividade citotóxica dos extratos orgânicos obtidos em cultura de células HCT-116 avaliadas pelo ensaio do MTT após 72hs de incubação. Os valores representam suas respectivas CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) e intervalo de confiança de 95% ($IC_{95\%}$)

| Bactérias associadas a ascídia <i>Euherdmania</i> sp. | | | |
|--|--------------------------------|-----------------|-------|
| Extrato | CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) | CI_{50} (95%) | R^2 |
| BRA 339 | 0,83 | 0,48 – 1,42 | 0,88 |
| BRA 340 | >50 | - | 0,79 |
| BRA 341 | 5,15 | 2,99 – 8,85 | 0,92 |
| BRA 342 | 0,59 | 0,33 – 1,06 | 0,91 |
| BRA 346 | 0,03 | 0,02 – 0,04 | 0,99 |
| BRA 347 | 2,57 | 1,61 – 4,10 | 0,95 |
| BRA 375 | 1,65 | 1,00 – 2,72 | 0,95 |
| BRA 386 | 1,19 | 0,89 – 1,59 | 0,99 |
| BRA 402 | >50 | - | 0,45 |
| BRA 405 | 49,04 | - | 0,81 |
| BRA 428 | 8,98 | 6,00 – 13,15 | 0,92 |
| BRA 473 | 16,46 | 11,17 – 24,26 | 0,96 |
| BRA 494 | 2,43 | 1,41 – 4,16 | 0,93 |
| Bactérias associadas a ascída <i>Eudistoma vannamei</i> | | | |
| BRA 373 | 0,85 | 0,42 – 1,71 | 0,91 |
| BRA 374 | 2,88 | 1,09 – 7,62 | 0,92 |
| BRA 378 | >50 | - | 0,63 |
| BRA 401 | 2,32 | 1,27 – 4,12 | 0,89 |
| BRA 403 | 22,50 | 6,36 – 79,61 | 0,76 |
| BRA 406 | 14,27 | 6,94 -29,31 | 0,92 |

Fonte: Elaborado pela autora.

4.2.2 BRA-342

O extrato bruto da BRA-342 quando testado em células tumorais apresentou CI_{50} de 0,59 $\mu\text{g/mL}$. Do seu fracionamento, obteve-se 7 frações que também foram avaliadas. A fração E apresentou menor concentração necessária para inibir 50% da proliferação celular, 0,04 $\mu\text{g/mL}$, o que estimulou o aprofundamento de seus estudos. A avaliação da toxicidade

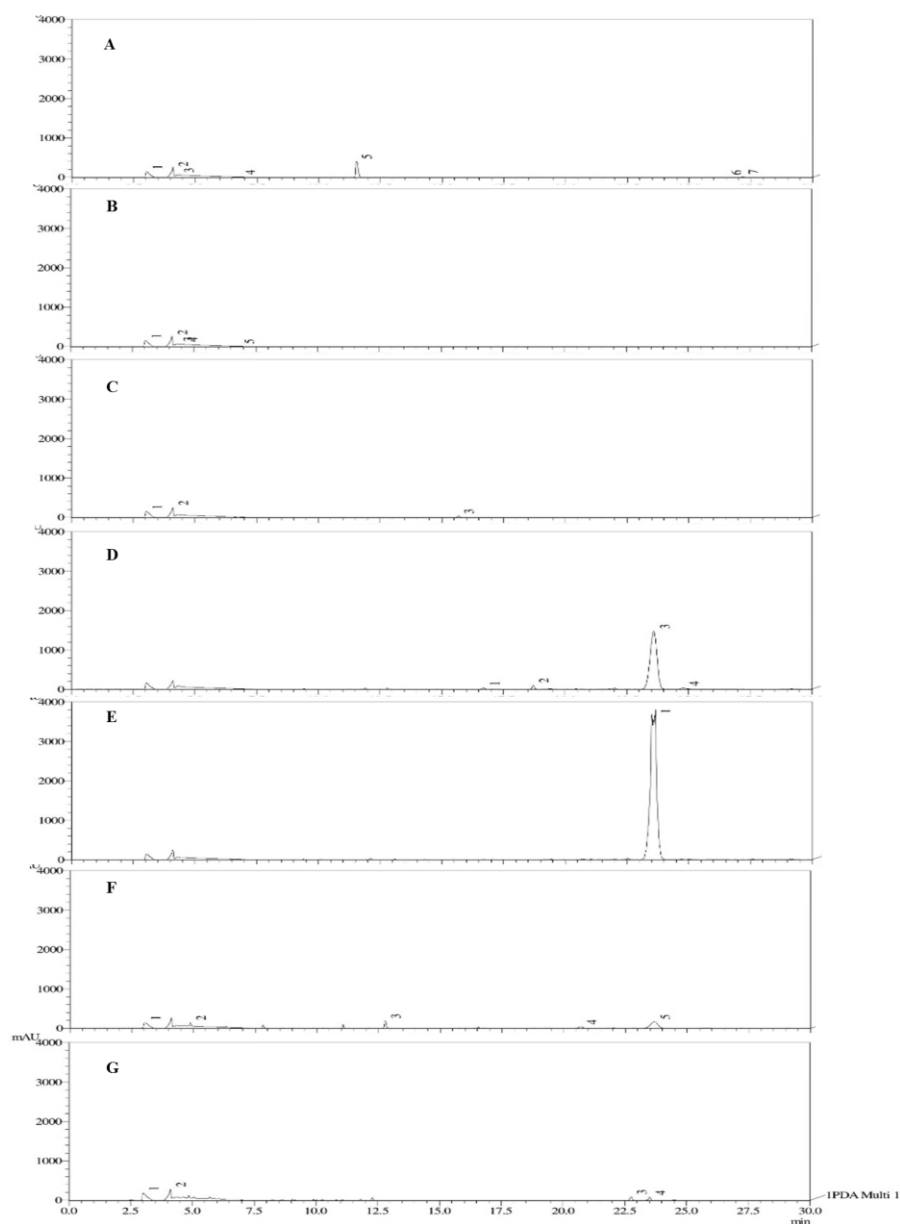
das frações da BRA-342 pode ser verificada na **Tabela 5** e os cromatogramas são apresentados no **Gráfico 5**.

Tabela 5 - Atividade citotóxica das frações D – G da BRA-342 em cultura de células HCT-116 avaliadas pelo ensaio do MTT após 72hs de incubação. Os valores representam suas CI_{50} e $IC_{95\%}$ em $\mu\text{g/mL}$

| Amostra | CI_{50} $\mu\text{g/mL}$ | $IC_{95\%}$ | R^2 |
|-----------|----------------------------|---------------|--------|
| BRA-342 D | 2,92 | 0,43 – 19,76 | 0,5394 |
| BRA-342 E | 0,04 | 0,01 – 0,10 | 0,8230 |
| BRA-342 F | 31,69 | 22,72 – 44,22 | 0,8998 |
| BRA-342 G | >50 | – | 0,5420 |

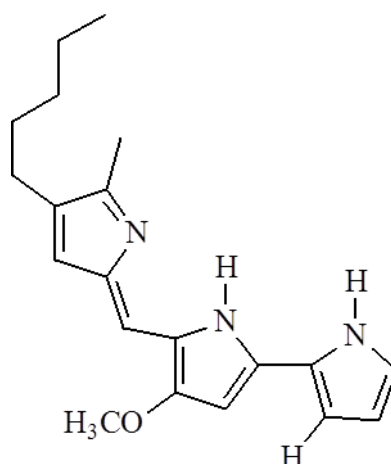
Fonte: Elaborada por Maria da Conceição de Menezes Torres.

Gráfico 5 - Cromatogramas das frações do extrato bruto da cepa BRA-342.



Fonte: Elaborado por Maria da Conceição Menezes Torres.

Figura 7. Estrutura química da prodigiosina, composto isolado das frações D e E do extrato da cepa BRA-342



Fonte: Elaborado por Maria da Conceição de Menezes Torres.

4.2.3 BRA-346

O extrato bruto obtido a partir do primeiro crescimento em larga escala apresentou atividade citotóxica com CI_{50} de 0,03 $\mu\text{g/mL}$. Seu primeiro fracionamento gerou sete frações, porém apenas as frações D e E apresentaram valores de CI_{50} interessantes, 1,49 e 0,13, respectivamente (**Tabela 6**).

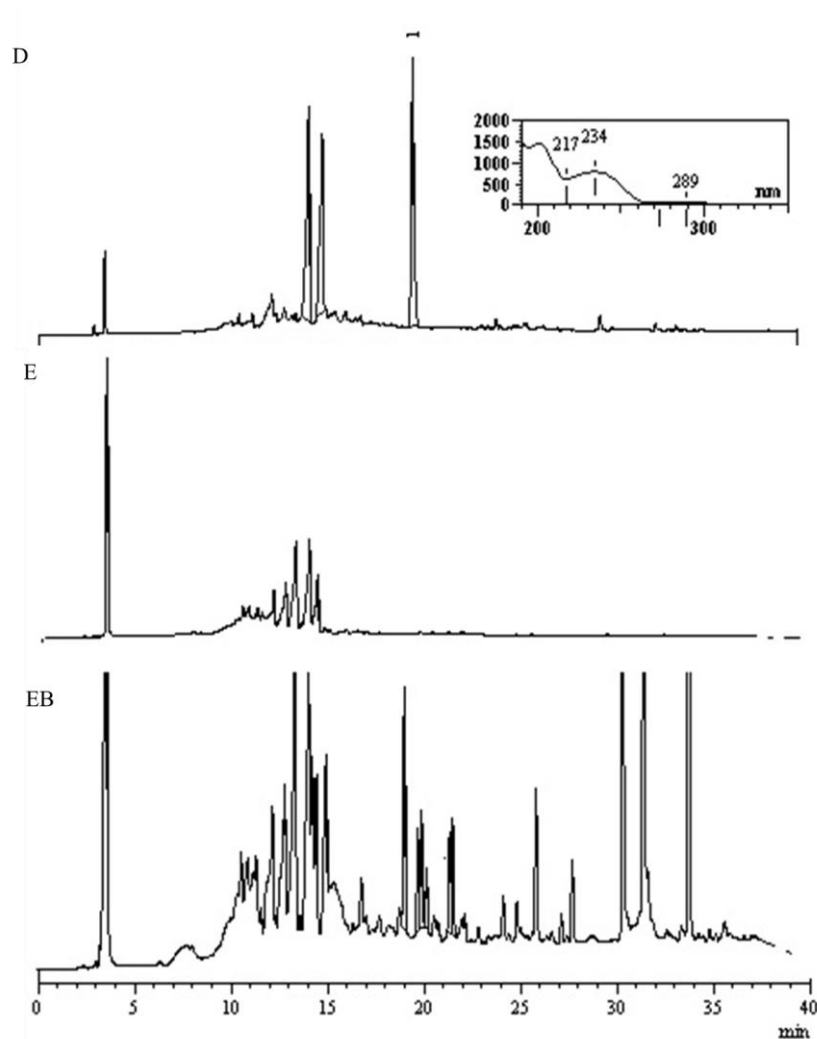
Tabela 6 - Atividade citotóxica das frações D e E obtidas do primeiro fracionamento e, do extrato bruto da BRA-346 em cultura de células HCT-116 avaliadas pelo ensaio do MTT após 72hs de incubação. Os valores representam suas CI_{50} e $IC_{95\%}$ em $\mu\text{g/mL}$

| Amostra | CI_{50} $\mu\text{g/mL}$ | $IC_{95\%}$ | R^2 |
|-----------|----------------------------|---------------|--------|
| BRA-346 | 0,003 | 0,023 – 0,040 | 0,9905 |
| BRA-346 D | 1,497 | 1,045 – 2,143 | 0,9812 |
| BRA-346 E | 0,138 | 0,109 – 0,175 | 0,9922 |

Fonte: Elaborada por Francisco das Chagas Lima Pinto.

A análise dos cromatogramas dessas frações ativas, D e E, indicaram a presença de compostos pertencentes a classes de moléculas já conhecidas, como piericidinas para fração D, dicetopiperazinas para fração E e lipopeptídeos dentre os vários picos presentes no extrato bruto (**Gráfico 6**).

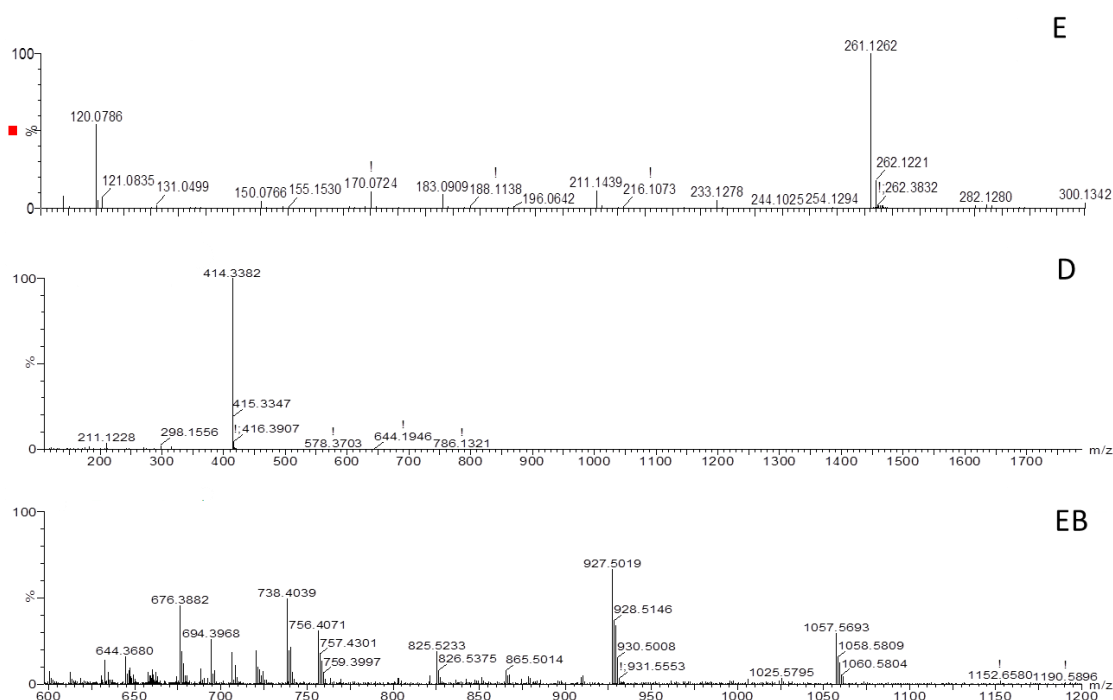
Gráfico 6 - Cromatogramas do extrato bruto (EB) e frações D e E obtidas a partir do primeiro fracionamento da cepa BRA-346



Fonte: Elaborado por Francisco das Chagas Lima Pinto.

A partir dos cromatogramas, foram feitos os espectros de massas para a análise das massas dos compostos presentes, o que permitiu confirmar a presença de compostos das classes propostas anteriormente (**Gráfico 7**).

Gráfico 7 - Espectros das frações E, D e extrato bruto (EB) da BRA-346 nos tempos de retenção (T_R) 3.761, 4.648 e 7.943 min



Fonte: Elaborado por Francisco das Chagas Lima Pinto.

O segundo cultivo, em larga escala, apresentou extrato bruto com CI_{50} de 0,053 $\mu\text{g/mL}$ e seu fracionamento apresentou, inicialmente, três frações advindas da partição do extrato com os solventes hexano, acetato e metanol. Dentre estas, a que apresentou maior potência foi a fração BRA-346 A, 0,01 $\mu\text{g/mL}$. Esta fração foi então fracionada em coluna de Sephadex LH-20 dando origem a cinco novas frações que também tiveram suas atividades citotóxicas avaliadas. Os valores podem ser acompanhados na **Tabela 7**.

Tabela 7 - Atividade citotóxica das frações obtidas da partição BRA-346 A em cultura de células HCT-116 avaliadas pelo ensaio do MTT após 72hs de incubação. Os valores representam suas CI_{50} e $IC_{95\%}$ em $\mu\text{g/mL}$

| Amostra | CI_{50} $\mu\text{g/mL}$ | $IC_{95\%}$ | R^2 |
|------------|----------------------------|----------------|--------|
| BRA-346-AA | 12,300 | 7,424 - 20,450 | 0,8838 |
| BRA-346-AB | 13,790 | 6,861 - 27,710 | 0,9003 |
| BRA-346-AC | 0,090 | 0,078 - 0,104 | 0,9893 |
| BRA-346-AD | 0,007 | 0,007 - 0,008 | 0,9983 |
| BRA-346-AE | 0,620 | 0,363 - 1,056 | 0,9731 |

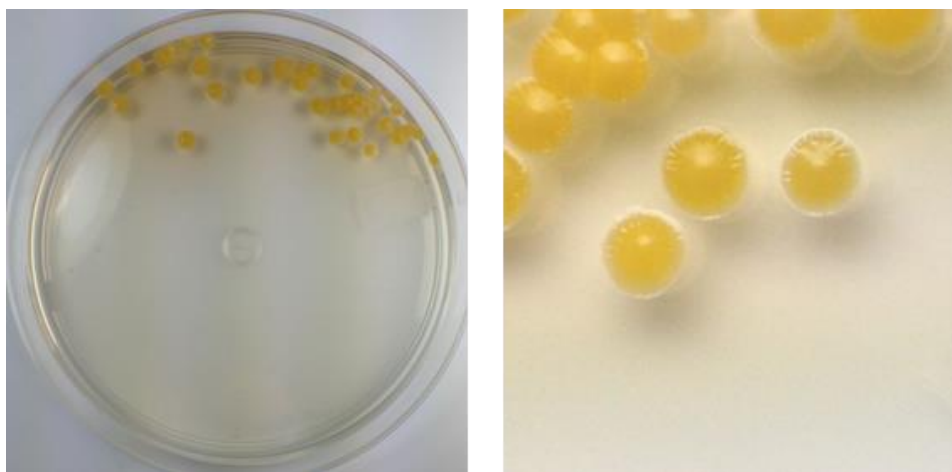
Fonte: Elaborada por Francisco das Chagas Lima Pinto.

4.3 Aspectos morfológicos das linhagens de bactérias produtoras de compostos ativos

Dentre as BRAs ativas, 15 cepas apresentam características visuais de actinomicetos, mostrando colônias de aparência rugosa, seca e grande quantidade de esporos. Já as outras quatro apresentaram características de bactérias gram-negativas, ausência de esporos, aparência brilhosa e mucoide. A **Figura 8** ajuda a ilustrar as características citadas.

Figura 8 - Fotos de bactérias recuperadas das ascídias *Eudistoma vannamei* e *Euherdmania* sp. que apresentaram extrato bruto com atividade citotóxica em linhagem celular tumoral HCT-116.

BRA-339



BRA-340

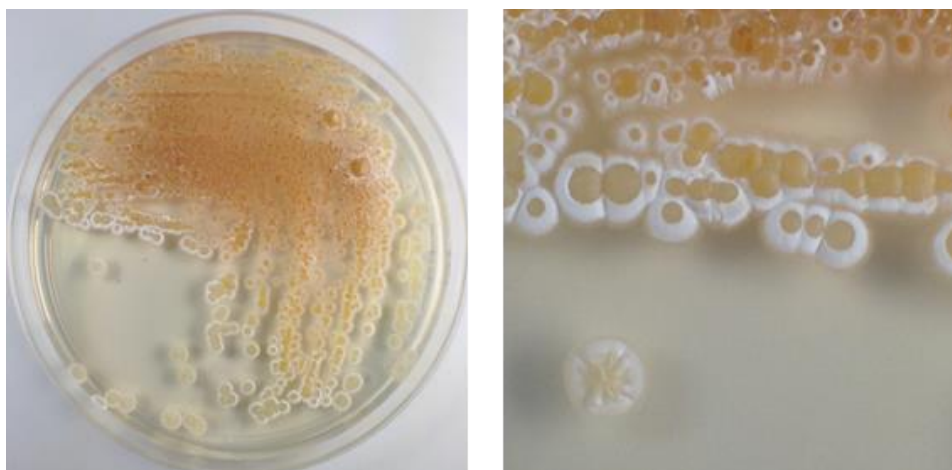
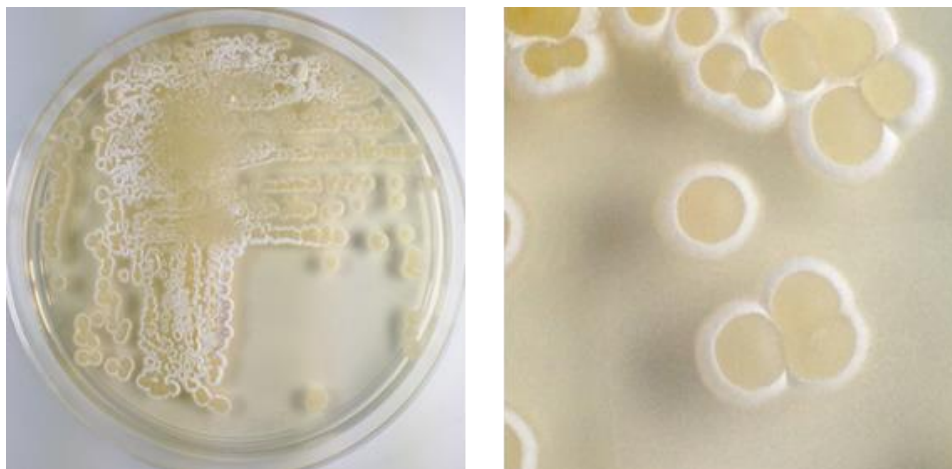
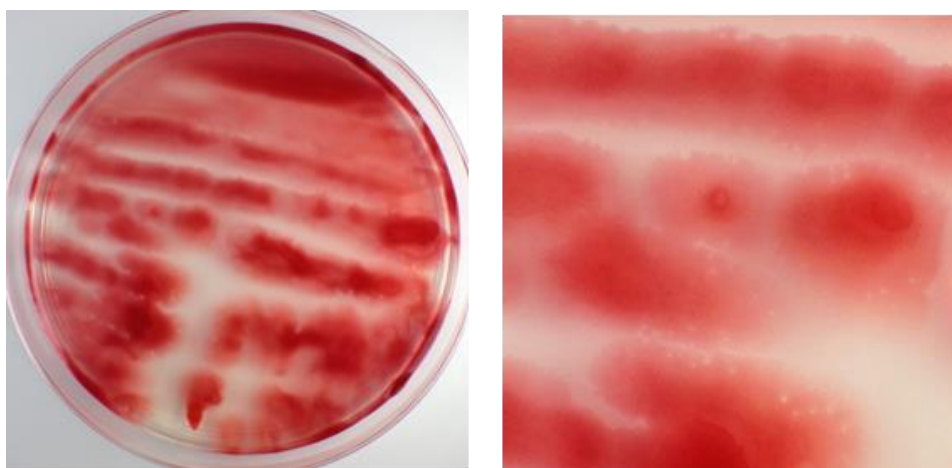


Figura 8 (continuação)- Fotos de bactérias recuperadas das ascídias *Eudistoma vannamei* e *Euherdmania* sp. que apresentaram extrato bruto com atividade citotóxica em linhagem celular tumoral HCT-116.

BRA-341



BRA-342

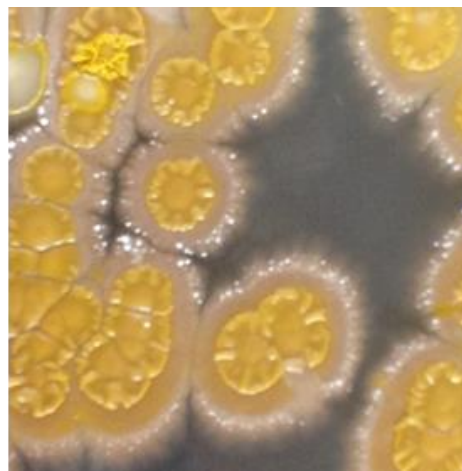
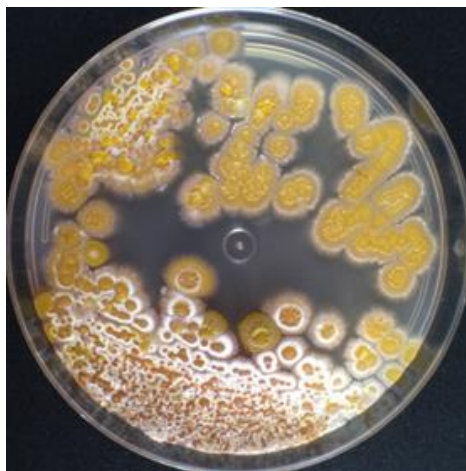


BRA-346

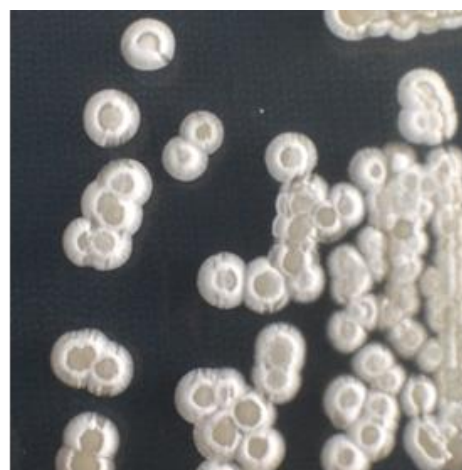


Figura 8 (continuação) - Fotos de bactérias recuperadas das ascídias *Eudistoma vannamei* e *Euherdmania* sp. que apresentaram extrato bruto com atividade citotóxica em linhagem celular tumoral HCT-116.

BRA-347



BRA-373

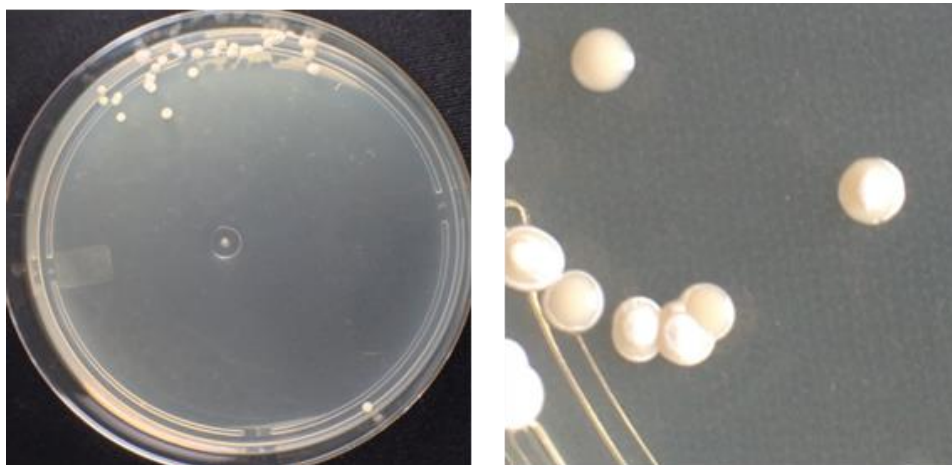


BRA-374

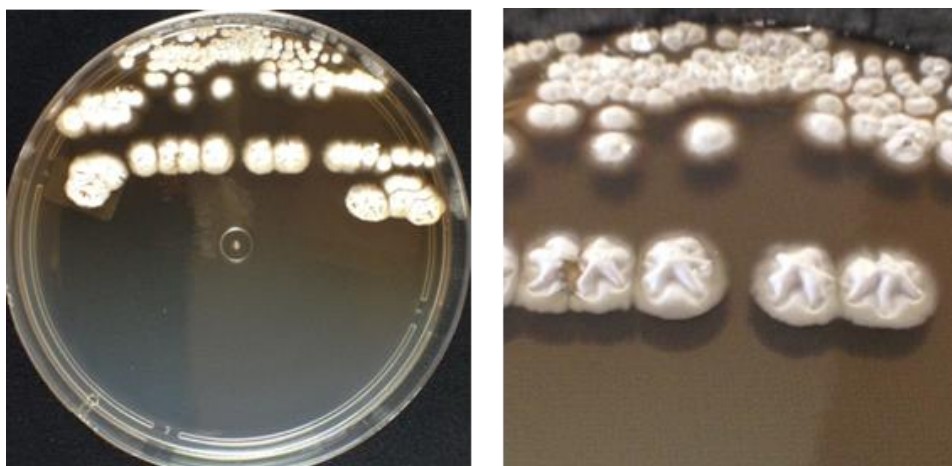


Figura 8 (continuação) - Fotos de bactérias recuperadas das ascídias *Eudistoma vannamei* e *Euherdmania* sp. que apresentaram extrato bruto com atividade citotóxica em linhagem celular tumoral HCT-116.

BRA-375



BRA-378



BRA-386

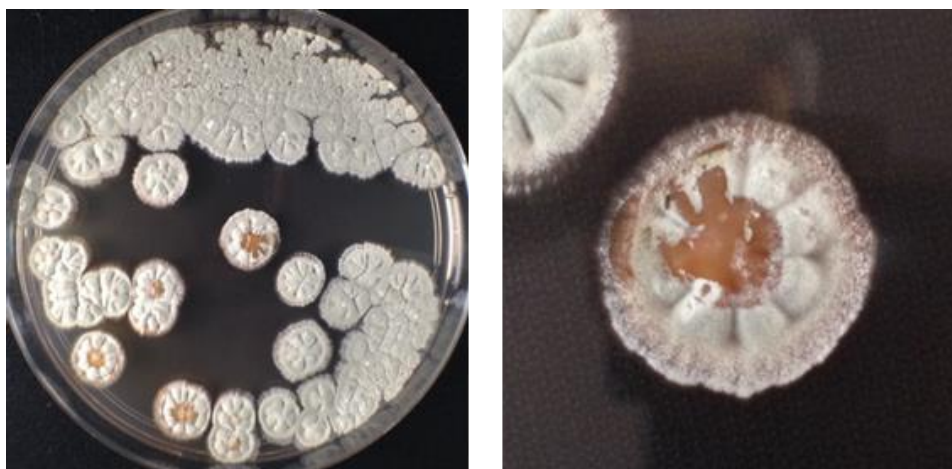
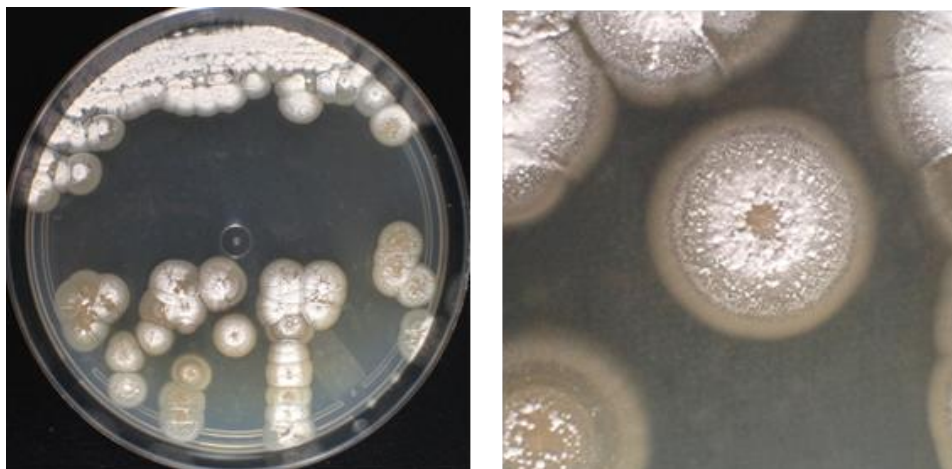
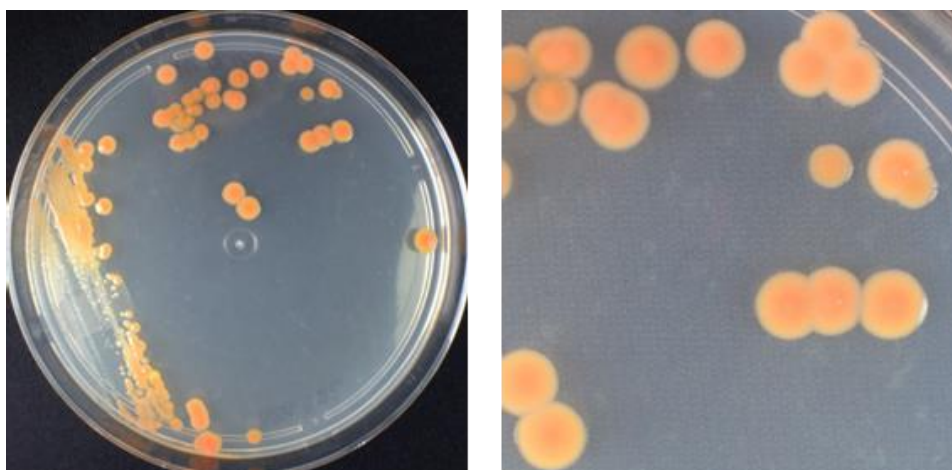


Figura 8 (continuação) - Fotos de bactérias recuperadas das ascídias *Eudistoma vannamei* e *Euherdmania* sp. que apresentaram extrato bruto com atividade citotóxica em linhagem celular tumoral HCT-116.

BRA-401



BRA-402



BRA-403

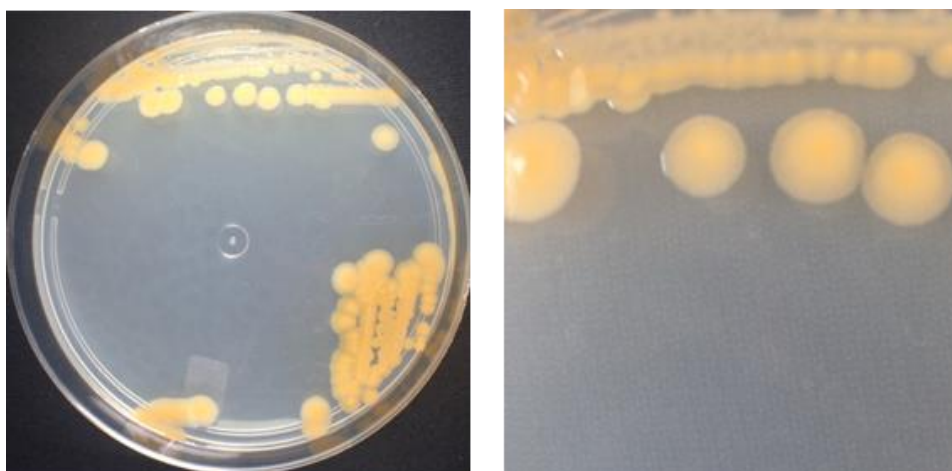


Figura 8 (continuação) - Fotos de bactérias recuperadas das ascídias *Eudistoma vannamei* e *Euherdmania* sp. que apresentaram extrato bruto com atividade citotóxica em linhagem celular tumoral HCT-116.

BRA-405



BRA-406



BRA-428

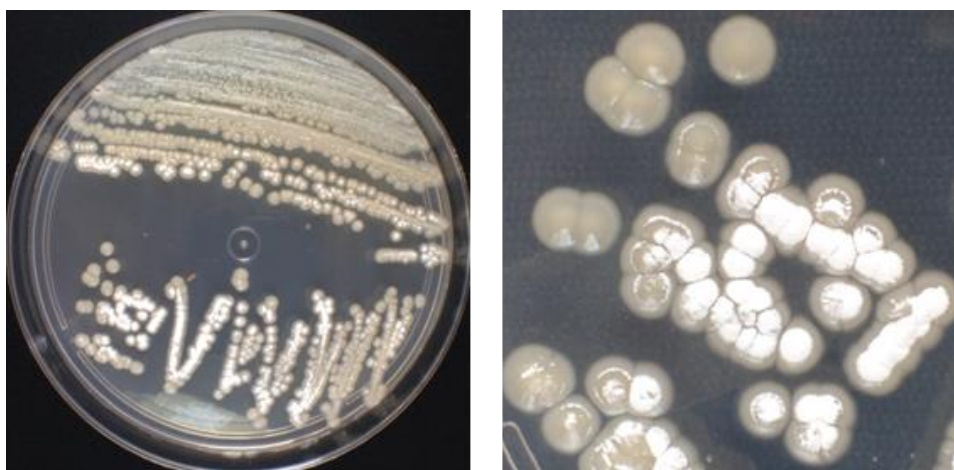


Figura 8 (continuação) - Fotos de bactérias recuperadas das ascídias *Eudistoma vannamei* e *Euherdmania* sp. que apresentaram extrato bruto com atividade citotóxica em linhagem celular tumoral HCT-116.

BRA-473



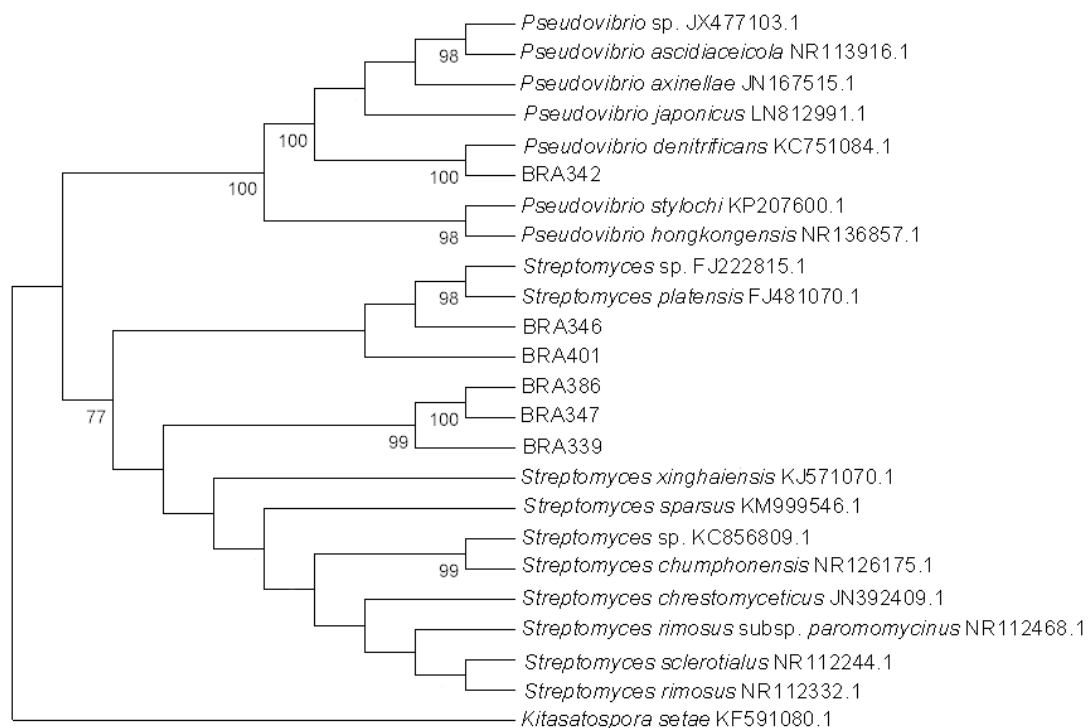
BRA-494



Fonte: Fotografias feitas por Diego Wilke e Luciana Furtado.

4.4 Identificação molecular

Algumas cepas com atividade citotóxica: BRA-339, BRA-342, BRA-346, BRA-347, BRA-386, BRA-401 foram sequenciadas. A BRA-342 foi identificada como pertencente ao gênero *Pseudovibrio* e as outras, ao gênero *Streptomyces* (**Gráfico 8**).

Gráfico 8 - Cladograma de agrupamento para parte das cepas que apresentaram extratos com citotoxicidade.

Fonte: Elaborado por Francisca Andréa da Silva Oliveira.

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho foram recuperadas 36 linhagens de micro-organismos a partir das ascídias *Eudistoma vannamei* e *Euherdmania* sp., coletadas na praia da Taíba-CE, com o intuito de investigar o seu potencial farmacológico. Do total de 36 micro-organismos isolados, 52% apresentaram citotoxicidade em células de carcinoma colorretal (HCT-116). Os resultados apresentados mostraram a importância da bioprospecção, diante da necessidade de descoberta de novas moléculas com atividade citotóxica, além de aumentar o conhecimento sobre a biodiversidade biológica e química do ambiente marinho, ainda pouco explorado. Por ser um problema mundial e de altíssima complexidade biológica, o câncer exige a busca por novas estruturas químicas na tentativa de aperfeiçoar os tratamentos hoje apresentados, sendo a bioprospecção de moléculas do ambiente marinho uma alternativa promissora para essa busca.

Os micro-organismos marinhos têm contribuído fortemente como produtores de substâncias utilizadas para o tratamento de diversas doenças. Seus produtos podem surgir como princípio ativo ou servir de modelo para produção de novos fármacos, principalmente para tratar neoplasias graves (LINDQUIST, 1991).

O esforço de isolamento desses micro-organismos levou à recuperação de 21 actinomicetos e 15 bactérias Gram-negativas. Os actinomicetos constituem um dos maiores filos dentro do domínio Bacteria. São bactérias Gram-positivas, produtora de esporos e de aparência peculiar quando cultivadas em meio sólido, apresentando colônias opacas e bordas irregulares ou não (BALDACCI *et al.*, 1953). Os meios utilizados, SWA, TMA e SCA favorecem a recuperação desse último tipo de micro-organismo, pois oferecem determinados nutrientes que impõem pressões seletivas importantes. Essas pressões ajudam a eliminar bactérias indesejáveis do isolamento, diminuindo a competição entre os micro-organismos (GONTANG *et al.*, 2007).

Muitos actinomicetos são recuperados eficientemente de sedimento marinho, através dos meios SCA, pois o amido e a caseína, fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente favorecem o desenvolvimento de actinomicetos (MALDONADO *et al.*, 2005). Isso corrobora com os resultados apresentados aqui, tais micro-organismos representam 75% dos isolados. Comparando a quantidade de bactérias recuperadas percebe-se que aproximadamente 40% delas são Gram-negativas, as quais representam apenas 21% dos extratos com atividade citotóxica.

A maior parte da recuperação de bactérias Gram-negativas se deu através do método M5 (trituração com aquecimento), o que mostra que a seleção dessas bactérias não sofreu influência da temperatura.

É comum o uso de métodos e meios específicos para favorecer o isolamento de cepas de actinomicetos marinhos associadas ao sedimento (ÖZCAN *et al.*, 2013; HAMEŞ-KOCABAŞ e UZEL, 2012; JENSEN *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 1994). Essas mesmas técnicas vêm sendo empregadas para a recuperação destes a partir de invertebrados. Dentro dos tratamentos, a aplicação de calor excessivo favorece o isolamento dos actinomicetos, visto que esses possuem esporos resistentes (SUBRAMANI *et al.*, 2013).

Porém uma das grandes dificuldades que se encontra é conseguir uma alta riqueza dos micro-organismos isolados. Apesar de terem sido recuperados 36 bactérias das duas amostras de ascídias, esse número é bastante pequeno diante da vasta diversidade de micro-organismos presentes no ambiente marinho. Estima-se que apenas 1% desses micro-organismos é cultivável e grande parte dessa ineficiência de recuperação é consequência da grande seletividade dos meios utilizados e da dificuldade de simular um ambiente estritamente igual ao marinho com as diversas pressões seletivas desse habitat, variações de pH, profundidade, salinidade e temperatura (TORSVIK *et al.*, 1990; TORSVIK *et al.*, 2002; MAGARVEY *et al.*, 2004; BULL, *et al.*, 2005; MANIVASAGAN, *et al.*, 2013).

Outro fator preponderante é a relação simbiótica desenvolvida por esses micro-organismos onde os organismos lhes fornecem nutrientes adequados. Em contrapartida, os micro-organismos podem produzir compostos para a proteção do hospedeiro (PENESYAN *et al.*, 2010; XIN *et al.*, 2008).

Os actinomicetos são conhecidamente produtores de compostos terapêuticos economicamente importantes, incluindo agentes antitumorais, antibióticos, enzimas e agentes imunossupressores. Dos 19 isolados que apresentaram extratos com atividade citotóxicas, 15 são actinomicetos, confirmando trabalhos que isolaram substâncias citotóxicas advindas de bactérias desse grupo. A salinosporamida A é um composto com atividade antitumoral produzido por actinomicetos do gênero *Salinispora Salinispora*, isolados de sedimento marinho. Esse potente composto é um potente inibidor de proteosoma 20S (FELING *et al.*, 2003).

As ascídias utilizadas nesse trabalho, *Eudistoma vannamei* e *Euherdmania* sp., possuem características específicas e alguns trabalhos já descreveram sua importante atividade citotóxica, inclusive o isolamento de compostos a partir de seus extratos.

Neste trabalho, da ascídia *Eudistoma vannamei* foram recuperadas 8 bactérias, das quais 6 apresentaram extratos brutos que inibiram mais de 75% da proliferação celular de células tumorais. Essa ascídia é uma espécie abundante na costa cearense. Possui cor alaranjada característica que se acredita tratar de um mecanismo de proteção contra predadores, visto que esse tipo de invertebrado é sésil e de corpo muito delicado. Um estudo com seu extrato apresentou CI_{50} abaixo de 2,0 $\mu\text{g/mL}$ contra células leucêmicas humanas (CEM). A partir desse trabalho, foram isoladas duas estaurosporinas inéditas, 2-hidroxi-7-oxoestaurosporina e 3-hidroxi-7-oxoestaurosporina, que apresentaram atividade citotóxica frente a linhagens neoplásicas. Seu mecanismo de ação envolve parada no ciclo celular na fase G2. Estudos mostraram que esses dois análogos, quando misturados, apresentam citotoxicidade 14 vezes maior que a estaurosporina (JIMENEZ *et al.*, 2003, 2012).

Abreu e colaboradores (2014) trabalharam com uma cepa de bactéria, pertencente ao gênero *Streptomyces*, também isolada dessa ascídia, da qual se isolou do extrato orgânico uma ditiolpirrolona citotóxica em células metastáticas de próstata e carcinoma de ovário, com CI_{50} que variavam de 1,0 a 6,4 μM . Esse composto causa apoptose, interferindo na citocinese.

Em relação à ascídia *Euherdmania* sp., da qual se recuperou 28 bactérias, percebeu-se que o meio SCA possibilitou o isolamento de praticamente 90% das cepas, dos

quais 64% são actinomicetos. Essa espécie tem distribuição pelo litoral do Ceará, crescendo sobre arenito exposto nas zonas entremarés. É uma espécie nova, aparentemente endêmica do Ceará, tendo sido encontrada inicialmente em Icapuí (LOTUFO, 2002). Jimenez e colaboradores (2003, 2004) mostraram que o extrato hidroalcoólico dessa ascídea possui atividade citotóxica contra células leucêmicas (CEM e HL-60), melanoma murino (B16) câncer de colon humano (HCT-8).

Apesar de ainda não haver relatos de extratos de bactérias isoladas da *Euherdmania* sp. com atividade citotóxica, dos 16 actinomicetos recuperados dessa ascídea, 10 possuem extratos citotóxicos, 7 deles com inibição entre 99 e 100% da proliferação celular quando testados em concentração de 50 µg/mL. Há também 3 bactérias Gram-negativas isoladas que renderam extratos com citotoxicidade.

Duas bactérias isoladas da *Euherdmania* sp., BRA-342 e BRA-346, mostraram-se produtoras de extratos altamente citotóxicos, com valores de CI_{50} na ordem de ng/mL. Essas 2 linhagens de bactérias foram então selecionadas para realizar um estudo mais aprofundado de seus compostos responsáveis pela atividade biológica.

O estudo bioguiado facilita o direcionamento na busca pela molécula-alvo, visto que o isolamento do composto é guiado pela atividade citotóxica. O fracionamento bioguiado do extrato da BRA-342 mostrou a presença de prodigiosina na fração mais ativa. A prodigiosina é um metabólito secundário produzido por diversos tipos de bactérias. Possui pigmentação vermelha e, em sua estrutura química, anéis cíclicos pirrólicos (PÉREZ-TOMÁS & VIÑAS, 2010). Conhecidas por apresentarem diversas atividades biológicas, algumas prodigiosinas possuem efeito apoptótico *in vitro* e *in vivo*, inibição da β -catenina em células de câncer de mama e apoptose em células de carcinoma hepático (WANG *et al.*, 2016; YENKEJEH *et al.*, 2016).

A identificação molecular da BRA-342 mostrou estreita relação filogenética dessa bactéria com a espécie *Pseudovibrio denitrificans*. Esta espécie foi isolada pela primeira vez em 2004 a partir de uma amostra de água do mar coletada na região costeira da Baía Nanwan, Parque Nacional de Kenting, Taiwan (SHIEH *et al.*, 2004). O gênero *Pseudovibrio* compreende um táxon de bactérias heterotróficas e anaeróbicas facultativas que é muito comumente encontrado em associação com organismos marinhos, como esponjas e tunicados (THIEL & IMHOFF, 2003; SHIEH *et al.*, 2004; FUKUNAGA *et al.*, 2006; SERTAN-DE GUZMAN *et al.*, 2007; MENEZES *et al.*, 2010).

A estreita relação entre ascídias e o gênero *Pseudovibrio* também foi relatada por Fukunaga e colaboradores (2006), que isolaram a bactéria *Pseudovibrio ascidiaceicola* das

ascídias *Polycitor proliferus* e *Botryllidae* sp. coletadas em uma praia no Oceano Pacífico na península Boso, Chiba, Japão.

Arthaud e colaboradores (2012) isolaram prodigiosina de uma bactéria recuperada de sedimento coletado na praia da Taíba-Ce. A bactéria produtora foi pertencente ao gênero *Pseudoalteromonas* e o composto apresentou atividade citotóxica contra linhagens tumorais de glioblastoma, carcinoma de cólon e melanoma. Em 2007 foi isolada heptylprodigiosina da bactéria *Pseudovibrio denitrificans* associada a um tunicado (SERTAN-DE-GUZMAN *et al.*, 2007).

Embora, o extrato da BRA-342 tenha sido bem interessante, os estudos foram descontinuados com essa bactéria após a identificação da prodigiosina, pois suas atividades biológicas já são bem conhecidas. Todavia, vale ressaltar o valor biotecnológico como ferramenta farmacológica e ao alto valor comercial da prodigiosina.

A outra bactéria com importante atividade citotóxica foi a BRA-346, a qual seu extrato apresentou CI_{50} de 30 ng/mL e uma de suas frações, a BRA-346 D, apresentou CI_{50} de 7 ng/mL. Tratando-se de uma fração, na qual ainda se tem várias moléculas juntas, essa concentração inibitória apresenta-se como um valor bem potente para os estudos *in vitro*. A análise do LC/MS das frações ativas desse extrato ainda não permitiu concluir qual o composto com atividade citotóxica.

O sequenciamento da região 16S do DNAr da BRA-346, bem como de outras bactérias produtoras de compostos citotóxicos, BRA-339, BRA-347, BRA-386 e BRA-401, revelou que são todas pertencentes ao gênero *Streptomyces*. Esse é um grupo abundante tanto no ambiente terrestre como aquático. (WAKSMAN & HENRICI, 1943). É um gênero com grande número de bactérias produtoras de compostos com atividade biológica. Dos mais de 10.000 compostos ativos isolados de actinomicetos, 7.500 são derivados de *Streptomyces* (MANIVASAGAN *et al.*, 2014).

Em 1977 um estudo de detecção de alcaloides possibilitou a descoberta de staurosporinas produzidas por *Streptomyces staurosporea* (OMURA *et al.*, 1977). Tais compostos têm propriedades antifúngica, antibacteriana, anti-hipertensiva e anticâncer.

Esse gênero também é grande produtor de diversas formas de piericidina. A piericidina A foi elucidada em 1965 por Tamura e Takahashi através de *Streptomyces mobaraensis* (TAKAHASHI *et al.*, 1965), e tem propriedade citotóxica.

As dicetopiperazinas, possivelmente presentes na fração E do extrato da BRA-346, são comumente encontradas em fungos do gênero *Penicillium*, podem também ser produzidas por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Esses são compostos com

atividade antimicrobiana, antitumoral, antihiperlicêmica, antiviral e antifúngica (HUANG *et al.*, 2010; DINSMORE & BESHORE, 2002).

Outra classe de moléculas que se acredita estar presente no extrato da BRA-346 são os lipopeptídeos. Estes são metabólitos primários biossintetizados por vários microorganismos. Tais lipopeptídeos pertencentes às classes das iturinas, surfactinas e fengicinas têm apresentado atividade biológica, inclusive, antifúngica e antibacteriana. São produzidos por bactérias marinhas do gênero *Bacillus*. Essas moléculas mostram grande promessa no desenvolvimento de novos quimioterápicos (KIM *et al.*, 2010; CAO *et al.*, 2010; KRACHT *et al.*, 1999).

Goutam e colaboradores (2016) isolaram isoformas da molécula Iturina A produzida pela bactéria marinha *Bacillus megaterium* recuperada da água do mar das ilhas Andaman e Nicobar na Índia. Os testes com esses compostos apresentaram efeito antiproliferativo e apoptótico *in vivo* em células de câncer de mama.

As bactérias desse trabalho pertencente ao gênero *Streptomyces* apresentaram potentes extratos citotóxicos, com frações apresentando CI_{50} de 7,6 ng/mL. Embora não tenha sido possível identificar compostos conhecidos na fração mais ativa (BRA-346 D), os indícios de possíveis moléculas das classes das piericidinas, dicetopiperazinas e lipopeptídeos merecem atenção, visto que esses compostos possuem atividade anticâncer já conhecida.

6 CONCLUSÃO

As bactérias associadas às ascídias *Eudistoma vannamei* e *Euherdmania* sp. coletadas na costa oeste do Ceará são fontes promissoras de substâncias com potencial anticâncer. Das 36 cepas bacterianas isoladas dessas ascídias, 53% renderam extratos com atividade citotóxica. As cepas dos extratos mais ativos, codificadas como BRA-342 e BRA-346 e identificadas como pertencentes aos gêneros *Pseudovibrio* e *Streptomyces*, respectivamente, concentraram maior citotoxicidade nas frações de polaridade intermediária. A cepa BRA-342 foi reconhecida como produtora de prodigiosina, composto citotóxico já conhecido e a cepa BRA-346 produz substâncias bastante citotóxicas ainda não identificadas. Esses resultados destacam o potencial farmacológico das bactérias *Pseudovibrio denitrificans* e *Streptomyces* sp. associadas a essas ascídias.

REFERÊNCIAS

ABREU, P. A.; SOUSA, T. S.; JIMENEZ, P. C.; WILKE, D. V.; ROCHA, D. D.; FREITAS, H. P.; PESSOA, O. D.; LA CLAIR, J. J.; COSTA-LOTUFO, L. V. Identification of pyrroloformamide as a cytokinesis modulator. **ChemBioChem**, v. 15, n. 4, p. 501-6, 2014.

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPES, M. T. P. 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. 118-29, 2005.

ARTHAUD, I. D. B.; RODRIGUES, F. A. R.; JIMENEZ, P. C.; MONTENEGRO, R. C.; ANGELIM, A. L.; MACIEL, 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**, v. 9, p. 418-27, 2012.

BALDACCI, E.; COMASCHI, G. F.; SCOTTI, T.; SPALLA, C. General criteria for the systematics of genera and species of Actinomycetes (*Streptomyces*) and *Micromonospora*, Symposium Actinomycetales, morphology, biology e sistematic, **VI Congresso Internazionale di Microbiologia**, p. 36. 1953.

BERGMANN, W. & BURKE, D. C. Contributions to the study of marine products. XL. The nucleosides of sponges. IV. Spongosine. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 22, p. 226-8, 1956.

BERGMANN, W. & FEENEY R. J. Contributions to the study of marine products. XXXII. The nucleosides of sponges. I. The **Journal of Organic Chemistry**, v. 16, p. 981-7, 1951.

BERGMANN, W. & STEMPIEN, M. F. Contributions to the study of marine products. XLIII. The nucleosides of sponges. V. The synthesis of spongosine. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 22, p. 1557-75, 1957.

BLUNT, J.; BUCKINGHAM, J.; MUNRO, M. Taxonomy and Marine Natural Products Research IN: FATTORUSSO, E.; GERWICK, W. H.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O. (Eds.) Handbook of Marine Natural Products. Dordrecht: Springer Netherlands, p. 1-4, 2012.

BRANNON-PEPPAS, L.; BLANCHETTE, J. O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 1649-59, 2004.

BULL, A.T.; STACH, J.E.M.; WARD, A.C.; GOODFELLOW, M. Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 87, p. 65-79, 2005.

CAO, X. H.; WANG, A.H.; WANG, C.L.; MAO, D.Z.; LU, M.F.; CUI, Y.Q.; JIAO, R.Z. Surfactin induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through a ROS/JNK-mediated mitochondrial/caspase pathway. **Chemico- Biological Interactions**, v. 183, n.3, p. 357-62, 2010.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drugs leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, p. 3670-95, 2013.

DAVIDSON, S. K.; ALLEN, S. W.; LIM, G. E.; ANDERSON, C. M.; HAYGOOD, M. G. Evidence for the Biosynthesis of Bryostatins by the Bacterial Symbiont "*Candidatus Endobugula sertula*" of the *Bryozoan Bugula neritina*. **American Society for Microbiology**, v. 7, n. 10, p. 4531-7, 2001.

DINSMORE, C. J. & BESHORE, D. C. Recent advances in the synthesis of diketopiperazines. **Tetrahedron**, v. 58, n. 17, p. 3297-3312, 2002.

EL SAYED, K. A.; BARTYZEL, P.; SHEN, X.; PERRY, T. L.; ZJAWIONY, J. K.; HAMMANN, M. T. Marine natural products as antituberculosis agents. **Tetrahedron**, v. 56, p. 949-53, 2000.

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 *Salinispora*. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 42, n. 3, p. 355-7, 2003.

FENICAL W. New pharmaceuticals from marine organisms. **Trends Biotechnology**, v. 15 n. 9, p. 339-41, 1997.

FENICAL, W. Marine Pharmaceuticals: Past, Present, and Future. **Oceanography**, v. 19, n. 2, p. 110-19, 2006.

FENICAL, W.; & JENSEN, P.R. Marine Microorganisms: A New Biomedical Resource. **Marine Biotechnology**, v. 1, Pharmaceutical and Bioactive Natural Products. (Attaway D.H., Zaborsky O.R., Eds.), p. 419-59, New York; London: Plenum Press, 1993.

FENICAL, W.; JENSEN, P. R. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. **Nature chemical biology**, v. 2, n. 12, p. 666-73, 2006.

FUKUNAGA, Y.; KURAHASHI, M.; TANAKA, K.; YANAGI, K.; YOKOTA, A.; HARAYAMA, S. *Pseudovibrio ascidiaceicola* sp. nov., isolated from ascidians (sea squirts). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 343-47, 2006.

GERWICK, W. H.; MOORE, B. S. Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology. **Chemistry & biology**, v. 19, n. 1, p. 85-98, 2012.

GONTANG, E. A.; FENICAL W.; JENSEN P. R. Phylogenetic diversity of gram-positive bacteria cultured from marine sediments. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 73, n. 10, p. 3272-82, 2007.

GOUTAM, D.; RASHMI, B.; INDRANIL, B.; DAS, A. K.; DAS, C. K.; DAS, S.; JENA, B. C.; MISRA, M.; SEM, R.; MANDAL, M. Pre-clinical risk assessment and therapeutic potential of antitumor lipopeptide 'Iturin A' in an *in vivo* and *in vitro* model. **RSC Advances**, v. 6, p. 71612-23, 2016.

HAMEŞ-KOCABAŞ, E.E.; UZEL, A. Isolation strategies of marine-derived actinomycetes from sponge and sediment samples. **Journal of Microbiological Methods**, v. 88, p. 342-7, 2012.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, p 57-70, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, 2011.

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**, v. 63, n. 8, p. 3233-41, 1997.

HUANG, R.; ZHOU, X.; XU, T.; YANG, X.; LIU, Y.; Diketopiperazines from Marine Organisms. **Chemistry & Biodiversity**, v. 7, n. 12, p. 2809-29, 2010.

HUNT, B. & VINCENT, A. C. J. Scale and Sustainability of Marine Bioprospecting for Pharmaceuticals. **Ambio**, v. 35, n. 2, 2006.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA.
Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil -
Rio de Janeiro: INCA, 2015. 122p.

JENSEN, P.R.; FENICAL, W. Marine microorganisms and drug discovery: current status and future potential. In: Nobushiro, F., ed. **Drugs from the sea**, 2000.

JENSEN, P.R.; GONTANG, E.; MAFNAS, C.; MINCER, T.J.; FENICAL, W. Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. **Environmental Microbiology**, v. 7, p. 1039-48, 2005.

JIMENEZ, P. C.; FORTIER, S. C.; LOTUFO, T. M. C.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. Biological activity in extracts of ascidians (Tunicata, Ascidiacea) from the northeastern Brazilian coast. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 287, p. 93-101, 2003.

JIMENEZ, P. C.; WILKE, D. V.; FERREIRA, E. G.; TAKEARA, R.; DE MORAES, M. O.; DA SILVEIRA, E. R.; DA CRUZ LOTUFO, T. M.; LOPES, N. P.; COSTA-LOTUFO, L. V. 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.

KAISER, O.; KIDERLEN, A. F.; CROFT, S. L.; Natural products as potential antiparasitic drugs. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 26, p. 779-848, 2002.

KIM, C.M.; LEC, K.H.; KWON, O.S.; SHIMAZU, A.; YOO, I.D.; Selective isolation of Actinomycetes by physical pre-treatment of soil sample. **Journal of Applied Environmental Microbial Biotechnology**, v. 22, p. 222-5, 1994.

KIM, P.I.; RYU, J.; KIM, Y.H.; CHI, Y. T. Production of biosurfactant lipopeptides Iturin A, fengycin and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 20, n.1, p. 138-45, 2010.

KRACHT, M.; ROKOS, H.; OZEL, M.; KOWALL, M.; PAULI, G.; VATER, J. Antiviral and hemolytic activities of surfactin isoforms and their methyl ester derivatives. **The Journal of Antibiotics**, v. 52, n. 7, p. 613-9, 1999.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870-4, 2016.

LINDIQUIST, N.; FENICAL, W.; VAN DUYN, G. D.; CLARDY, J. Isolation and structure determination of diazonamides A and B, unusual cytotoxic metabolites from the marine ascidian *Diazona chinensis*. **Journal of the Chemical Society**, v. 113, p. 2303-4, 1991.

LIU, X.; XU, F.; SHAO, C.; SHE, Z.; LIN, Y.; CHAN, W.L. Bioactive metabolites from marine microorganisms. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 35, p. 197–310, 2008.

LOTUFO, T. M. C. Ascidiacea (Chordata: Tunicata) do litoral tropical brasileiro. Tese de doutorado. **Instituto de Biociências**. Universidade de São Paulo, São Paulo, 183pp.

LOURO, I. D. et al. **Genética Molecular do Câncer**. 1 ed. São Paulo: MSG Produção Editorial, 2002.

MAGARVEY, N. A.; KELLER, J. M.; BERNAN, V.; DWORKIN, M.; SHERMAN, D. H. Isolation and characterization of novel marine-derived actinomycete taxa rich in bioactive metabolites. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 12, p. 7520-9, 2004.

MALDONADO, L. A.; STACH, J. E. M.; PATHOM-AREE, W.; WARD, A. C.; BULL, A. T.; GOODFELLOW, M. Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 87, p. 11–8, 2005.

MANIVASAGAN, P.; VENKATESAN, J.; SIVAKUMAR, K.; KIM, S. Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. **Microbiological research**. v. 169, n. 4, p. 262-78, 2014.

MAYER, A. M. S.; GLASSER, K. B.; CUEVAS, C.; JACOBS, R. S.; KEM, W.; LITTLE, R. D.; MCLINTOSH, J. M.; NEWMAN, D. J.; POTTS, B. C.; SHUSTER, D. E. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 31, n. 6, p. 255-65, 2010.

MENEZES, C. B. A.; BONUGLI-SANTOS, R. C.; MIQUELETTO, P. B.; PASSARINI, M. R. Z.; SILVA, C. H. D.; JUSTO, M. R.; LEAL, R. R.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; OLIVEIRA, V. M.; BERLINCK, R. G. S.; SETTE, L. D. Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil. **Microbiological Research**, v. 165, p. 466-82, 2010.

MOHAPATRA, B. R.; BAPUJI, M.; SREE, A. Antifungal efficacy of bacteria isolated from marine sedentary organisms. **Folia Microbiol. (Praha)**. v. 47, p. 51-5, 2002.

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

MUSCHOLL-SILBERHORN, A.; THIEL, V.; IMHOFF, J. F. Abundance and bioactivity of cultured sponge-associated bacteria from the Mediterranean Sea. **Microbial Ecology**, v. 55, n. 1, p. 94-106, 2008.

NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI). Disponível em: <<http://www.cancer.gov/about-cancer>>. Acesso em: 19 dez. 2016.

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, n. 3, p. 311-35, 2012.

NEWMAN, D.; CRAGG, G. Drugs and Drug Candidates from Marine Sources: An Assessment of the Current “State of Play”. **Planta Medica**, v. 82, n. 09/10, p. 775-89, 2016.

OLIVEIRA, B. M.; GRAY, W. R.; ZEIKUS, R.; MCLINTOSH, J. M.; VARGA, J.; RIVIER, J.; SANTOS, V.; CRUZ, L. J. Peptide neurotoxins from fish-hunting cone snails. **Science (New York, N. Y.)**, v. 230, n. 4732, p. 1338-43, 1985.

OMURA, S.; IWAI, Y.; HIRANO, A.; NAKAGAWA, A.; AWAYA, J.; TSUCHYA, H.; TAKAHASHI, Y.; MASUMA, R. A new alkaloid AM-2282OF Streptomyces origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization. **Journal of Antibiotics**, v. 30, n. 4, p. 275-82, 1977.

OZCAN, K.; AKSOY, S. C.; KALKAN, O.; UZEL, A.; HAMES-KOCABAS, E. E.; BEDIR, E. 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, 2013.

PEREIRA, R.C.; SOUSA-PINTO, I.; GAMA B.A.P. Macroalgal chemical defenses and their roles in structuring tropical marine communities. **Algal Chemical Ecology**. Ed. Springer, Berlim, p. 25-55, 2008.

PÉREZ-TOMÁS, R.; VIÑAS, M. New insights on the antitumoral properties of prodiginines. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 21, p. 2222-31, 2010.

PENESYAN, A.; KJELLEBERG, S.; EGAN, S. Development of Novel Drugs from Marine Surface Associated Microorganisms. **Marine Drugs**, v. 8, n. 3, p. 438-459, 2010.

POMPONI, S.A. The Oceans and Human Health: The Discovery and Development of Marine-Derived Drugs. **Oceanography**, v. 14, n. 1, p. 78– 87, 2001.

PROKSCH, P.; EDRADA, R.A., EBEL, R. Drugs from the seas – current status and microbiological implications. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 59, p. 125–34, 2002.

RATH, M. C.; JANTO, B.; EARL, J.; AHMED, A.; HU, F. Z.; HILLER, L.; DAHLGREN, M.; KREFT, R.; YU, F.; WOLFF, J. J.; KWEON, H. K.; CHRISTIANSEN, M. A.; HAKANSSON, K.; WILLIAMS, R. M.; EHRLICH, G. D.; SHERMAN, D. H. Meta-omic Characterization of the Marine Invertebrate Microbial Consortium That Produces the Chemotherapeutic Natural Product ET-743. **ACS Chemical Biology**, v. 6, n. 11, p.1244-56, 2011.

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**, v. 2, n. 2, p. 92-6, 2012.

RODRIGUES, S. A.; ROCHA, R. M. & LOTUFO, T. M. C. **Guia ilustrado para identificação das ascídias do Estado de São Paulo**. São Paulo, IBUSP/FAPESP, p. 1-190, 1998.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406– 25, 1987.

SCHMIDT, G. H.; WARNER, G. F. Effects of caging on the development of a sessile epifaunal community. **Marine Ecology - Progress Series**, v. 15, p. 251-263, 1984.

SEED, R. & R. J. O’CONNOR. Community organization in marine algal epifaunas. **Annual Review Ecology and Systematics**, v. 12, p. 49-74, 1981.

SERTAN-DE GUZMAN, A.A.; PREDICALA, R.Z.; BERNARDO, E. B.; NEILAN, B.A.; ELARDO, S. P.; MANGALINDAN, G.C.; TASDEMIR, D.; IRELAND, C.M.; BARRAQUIO, W.L.; CONCEPCION, G.P. *Pseudovibrio denitrificans* strain Z143-1, a heptylprodigiosin-producing bacterium isolated from a Philippine tunicate. **FEMS Microbiology Letters**, v. 277, n. 2, p. 188-9, 2007.

SHIEH, W. Y.; LIN, Y. T.; JEAN, W. D. *Pseudovibrio denitrificans* gen. nov., sp. nov., a marine, facultatively anaerobic, fermentative bacterium capable of denitrification. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, v, 54, p. 2307-12, 2004.

SUBRAMANI, R.; KUMAR, R.; PRASAD, P.; AALBERSBERG, W. Cytotoxic and antibacterial substances against multi-drug resistant pathogens from marine sponge symbiont: citrinin, a secondary metabolite of *Penicillium* sp. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, p. 291-6, 2013.

TAKAHASHI, N.; SUZUKI, A & TAMURA, S. Structure of Piericidin A. **Journal of the American Chemical Society**, v. 87, n. 9, p. 2066-8, 1965.

THAKUR, A. N.; THAKUR, N. L.; INDAP, M. M.; PANDIT, R. A.; DATAR, V. V.; MÜLLER, W. E. G. Antiangiogenic, antimicrobial and cytotoxic potential of sponge-associated bacteria. **Marine Biotechnology**, v. 7, p. 245–52, 2005.

THIEL, V.; IMHOFF, J. F. Phylogenetic identification of bacteria with antimicrobial activities isolated from Mediterranean sponges. **Biomolecular Engineering**, v. 20, p. 421-23, 2003.

TODD C.D.; TURNER S.J. Ecology of intertidal and sublittoral cryptic epifaunal assemblages. Nonlethal overgrowth of encrusting bryozoans by colonial ascidians. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 115, p. 113-26, 1988.

TORSVIK, V.; GOKSOYR, J.; DAAE, F. L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 782-7, 1990.

TORSVIK, V.; ØVREÅS, L.; THINGSTAD, T. F. Prokaryotic Diversity--Magnitude, Dynamics, and Controlling Factors. **Science**, v. 296, p. 1064-6, 2002.

XIN, Y.; HUANG, J.; DENG, M.; ZHANG, W. Culture-independent nested PCR method reveals high diversity of actinobacteria associated with the marine sponges *Hymeniacidon perleve* and *Sponge* sp. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 94, n. 4, p. 533-42, 2008.

YENKEJEH, R. A.; SAM, M. R.; ESMAEILLOU, M. Targeting survivin with prodigiosin isolated from cell wall of *Serratia marcescens* induces apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. **Human & Experimental Toxicology**, 2016.

WAKSMAN, S. A., and HeNRICI, A. T. The nomenclature and classification of the actinomycetes. **Journal of Bacteriology**, v. 46, p. 337, 1943.

WANG, Z.; LI, B.; ZHOU, L.; YU, S.; SU, Z.; SONG, J.; SUN, Q.; SHA, O.; WANG, X.; JIANG, W.; WILLERT, K.; WEI, L.; CARSON, D.A.; LU, D. Prodigiosin inhibits Wnt/ β -catenin signaling and exerts anticancer activity in breast cancer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 46, p.13150-5, 2016.

WARD, A.C.; & BORA, N. Diversity and biogeography of marine actinobacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v, 9, p. 279-86, 2006.

WATERS, A. L.; HILL, R. T.; PLACE, A. R.; HAMANN, M. T. The expanding role of marine microbes in pharmaceutical development. **Current Opinion in Biotechnology**, v, 21, p. 780-6, 2010.

WILLIAMS, P. G. Panning for chemical gold: marine bacteria as a source of new therapeutics. **Trends in biotechnology**, v. 27, n. 1, p 45-52, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Cancer Country Profiles**. 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em: 19 dez. 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Cancer. Media Centre**. 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 19 dez. 2016.

ZHANG, L.; NA, R.; WANG, J.; SUN, N.; ZHANG, S.; HU, J.; KUAI, J. Exploring novel bioactive compounds from marine microbes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 276-281, 2005.