



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

CLARA NORÕES NOGUEIRA

**PROSPECÇÃO DE COMPOSTOS COM POTENCIAL ANTICÂNCER OBTIDOS DE
MICRORGANISMOS ASSOCIADOS À ASCÍDIA *EUHERDMANIA SP.***

FORTALEZA
2019

CLARA NORÕES NOGUEIRA

PROSPECÇÃO DE COMPOSTOS COM POTENCIAL ANTICÂNCER OBTIDOS DE
MICRORGANISMOS ASSOCIADOS À ASCÍDIA *EUHERDMANIA SP.*

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia aplicada à saúde.

Orientador: Prof. Dr. Diego Veras Wilke

Aprovada em: __/__/____.

BANCA EXAMINADORA

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

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

Dr. Francisco das Chagas Lima Pinto
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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)

N711p Nogueira, Clara Norões.

Prospecção de compostos com potencial anticâncer obtidos de microrganismos associados à *Euherdmania* sp. / Clara Norões Nogueira. – 2019.

79 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2019.

Orientação: Prof. Dr. Diego Veras Wilke.

1. Produtos naturais marinhos. 2. Microrganismos associados a invertebrados marinhos. 3. Prodigininas. 4. Potencial anticâncer. 5. Heptilprodigosina. I. Título.

CDD 661

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Ricardo Emílio Nogueira e Albaceli Nogueira**, pelo apoio e amor incondicional. Por terem sempre priorizado a minha educação e incentivado minha carreira científica. Sem vocês, nada disso seria possível. Por serem os maiores exemplos de dedicação, força e amor que eu conheço.

À minha irmã, **Helena Norões**, pelas risadas, apoio e companhia. Por ser fonte de grande orgulho e um exemplo do que dedicação e esforço podem alcançar. Por sempre me incentivar e torcer por mim em todos os momentos.

Ao Professor Doutor **Diego Veras Wilke**, por me aceitar no laboratório de braços abertos. Por sempre me incentivar a buscar o conhecimento, o aprimoramento das minhas habilidades e o aprendizado. Por acreditar em mim, investir na minha pesquisa e carreira, por impactar tão positivamente a minha formação. Sem o seu esforço e dedicação a realização desse trabalho não seria possível.

À mestra **Katharine Gurgel Dias**, minha coorientadora, por toda a dedicação, paciência e ensinamentos. Por ser um exemplo de cientista, pela amizade e por toda a ajuda dedicada para a realização deste trabalho.

À **Evelline Edson e Maísa Viana**, pela disponibilidade em auxiliar quando necessário. Por todos os ensinamentos passados e conhecimento discutido.

À mestra **Erlânia Alves**, por todos os ensinamentos quando eu iniciei a linha de pesquisa. Sua paciência e atenção ao me ensinar novas técnicas.

À mestra **Tháís Brito**, pela amizade e auxílio na análise dos dados do sequenciamento.

À Professora Doutora **Otília Pessoa** e seu colaborador Doutor **Francisco das Chagas** pela contribuição imensurável ao trabalho, disponibilidade de cooperação e pelo auxílio na identificação, isolamento e purificação das amostras utilizadas no trabalho.

Ao Professor Doutor **Kirley Santiago** e seu colaborador **Paulo Ricelli** da EMBRAPA, por seu auxílio e disponibilidade.

À Professora Doutora **Vânia Maciel Melo**, à Doutora **Francisca Andréa Oliveira** pelo auxílio na purificação e envio de amostras para o sequenciamento.

Ao Professor Doutor **Roberto César** por aceitar o convite para participar da banca e contribuir para o aprimoramento deste trabalho.

A todos os integrantes do LaBBMAR (Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia Marinha) **Laura, Keilla, Rhaynan, Alexia, Felipe, Elthon, Priscila e Sabrina** pela convivência diária, amizade, atenção e troca de conhecimentos.

Às amigas do colégio Santo Inácio, **Maria Clara, Mariana, Iara e Gabriella**, que mesmo sem entender os pormenores do trabalho sempre forneceram apoio e me incentivaram a seguir os meus sonhos.

Às minhas meninas, **Luzia, Raíssa e Vanessa** pelo apoio durante toda a graduação. Pelo auxílio em disciplinas, momentos de descontração e grande carinho. Vocês são parte importante dessa conquista e grande fonte de orgulho.

Aos demais amigos do curso, **Joaquim, Thaís, Markos, Luisa, Symon, João Neto e Israel** (*in memoriam*) pelos momentos felizes, realização de trabalhos e tantas ocasiões em que estivemos juntos.

Aos queridos **Davi, Heitor, Lucas, Letícia, Mariana e Remerson**, por todas as ocasiões em que estivemos juntos este ano.

A todos os professores do Bacharelado em Biotecnologia pelos conhecimentos adquiridos.

A todos que torceram ou contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

“Você pode testar e diversificar seus métodos como quiser, também seus gostos, hábitos e atitude intelectual, mas sua alma é revelada por suas ações”

Agatha Christie

RESUMO

Câncer é uma das doenças com a maior taxa de mortalidade globalmente, sendo caracterizado pelo crescimento anormal de células com o potencial de espalhamento para tecidos diferentes daquele de sua origem. Grande parte dos quimioterápicos disponíveis na clínica são fármacos citotóxicos, cuja especificidade e eficácia ainda não se aproximam dos parâmetros ideais. A busca por novos quimioterápicos de fontes naturais é bastante promissora. Prova disso é fato que os principais quimioterápicos de uso consagrado na clínica são produtos naturais ou compostos derivados destes. Os produtos naturais marinhos (PNM), são fonte interessante de moléculas em fase pré-clínica e de quimioterápicos com alta potência. Estudos com extrato orgânico da ascídia *Euherdmania* sp. bem como de bactérias associadas ao animal, do litoral cearense, mostram diversas atividades biológicas, inclusive citotóxica, sendo uma fonte interessante para a prospecção de microrganismos produtores de metabólitos secundários com atividade antitumoral. A utilização de microrganismos como fontes de biomoléculas representa tanto um custo de produção menor, quanto uma menor exploração da biodiversidade. O objetivo deste trabalho foi prospectar compostos citotóxicos contra células tumorais a partir de microrganismos associados à *Euherdmania* sp. A ascídia *Euherdmania* sp. e o sedimento associado ao animal, coletados na praia de Taíba-CE, foram processados para cultivo de microrganismos associados em meio ágar suplementado com extrato de ascídia. Os esforços para isolar bactérias resultaram na obtenção e isolamento de 10 cepas bacterianas. Estas tiveram seu extrato acetato de etila testado para atividade anticâncer contra células tumorais linhagem de câncer de cólon (HCT 116) através do ensaio da sulforodamina B (SRB), com incubação de 72 horas. Extratos com citotoxicidade acima de 75% na concentração 50 µg/mL foram selecionados para cálculo da concentração inibitória média (CI₅₀). Os extratos ativos foram os de: BRA-612, BRA-613, BRA-616, BRA-624 e BRA-632. Da cepa BRA-612 foram isoladas e identificadas 2 prodigininas, a prodigiosina e a heptilprodigiosina. O rendimento desta última foi de 9% no cultivo em meio A1 sólido. A citotoxicidade da heptilprodigiosina foi estudada pela primeira vez neste trabalho. Ela apresentou CI₅₀ = 94 nM contra a linhagem HCT 116 e igual a 195 nM contra melanoma metastático (B16-F10) após 72 horas. O sequenciamento e análise do 16S rDNA permitiu a identificação da BRA-612 como sendo do gênero *Pseudovibrio* sp., e foi denominada *Pseudovibrio* sp. BRA-612. Desta forma, o presente trabalho resultou no isolamento *Pseudovibrio* sp. BRA-612, produtora de heptilprodigiosina com alto rendimento em condições simples de cultivo, e também foi primeiro estudo da citotoxicidade desta molécula.

Palavras-chave: Produtos naturais marinhos, microrganismos associados a invertebrados marinhos, *Euherdmania* sp., potencial anticâncer, prodigininas, heptilprodigiosina.

ABSTRACT

Cancer is the second most prominent cause of death among the world, being characterized with cells presenting abnormal growth and the ability to invade tissues unlike the one of origin. Most of the chemotherapeutics drugs available in clinic are cytotoxic, with specificity and efficacy below the desirable parameters. The search for new chemotherapeutics of marine source is highly promising. A proof of that is most chemotherapeutics in commercial have a natural source, or are derived from natural products. Marine natural products (MNP) are interesting sources of molecules in pre-clinical phase or pharmaceuticals with high potency. Organic extracts of ascidian *Euherdmania* sp., as well as the bacteria associated to it, from the Ceará's litoral show a diversity of biological activities, including cytotoxicity, therefore being an interesting source for the prospection of microorganisms that produce secondary metabolites with anticancer potential. The principal aim of this work was the prospection of compounds with anticancer potential from microorganisms associated to *Euherdmania* sp. The ascidian and its associated sediment, collected in Taíba - CE, were processed and had its microbiota cultivated in a medium containing a nutritive ascidian extract. From this procedure were obtained 10 isolated strains. These had their organic extracts tested against HCT 116 colorectal cancer cell lines in the Sulforhodamine B (SRB) assay, with 72 hours of incubation. Extracts presenting cytotoxicity above 75% were selected for the calculation of the medium inhibitory concentration IC_{50} . The extracts considered cytotoxic were those of the following bacteria: BRA-612, BRA-613, BRA-616, BRA-624 and BRA-632. Results found indicate the presence of substances belonging to the prodiginine class in the strain BRA-612. Heptylprodigiosin was found in the extract, with and IC_{50} of 0,094 μ M against HCT 116 cell lines and an IC_{50} 0,195 μ M against B16-F10 cell lines. The cytotoxicity of heptylprodigiosin was first announced in this work. The 16S rDNA sequencing allowed the identification of BRA-612 as a member of the *Pseudovibrio* sp. family, being referred to as *Pseudovibrio* sp. BRA-612. Therefore, heptylprodigiosin was obtained with a yield of 9% and novel anticancer activity *in vitro*, reinforcing the biotechnological potential of molecules derived from marine invertebrates.

Key Words: Marine natural products, microorganisms associated to marine invertebrates, anticancer potential, prodiginines, heptylprodigiosin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Capacidades adquiridas pelas células tumorais, denominadas de Hallmarks do câncer.....	17
Figura 2 -	Distribuição dos diferentes interesses de grupos de pesquisa trabalhando com biotecnologia marinha no Brasil.....	20
Figura 3 -	Ilustração contendo as principais etapas do trabalho. Coleta, processamento, isolamento, criopreservação, extração, purificação e testes de viabilidade celular.....	29
Figura 4 -	Informações sobre a coleta. Localização geográfica, ponto de coleta, animal coletado e poça de maré onde o animal foi encontrado.....	30
Figura 5 -	Foto da trituração de <i>Euherdmania</i> sp. com tesoura e bisturi cirúrgico em cadinho para a preparação do extrato de ascídia.....	33
Figura 6 -	Figura contendo fluxograma das etapas de extração líquida e sólida e obtenção do extrato orgânico.....	34
Figura 7 -	Figura contendo fluxograma para a realização de avaliação da proliferação celular por sulforodamina B.....	39
Figura 8 -	Fotos das BRAs obtidas e depositadas em banco. Fotos da placa e zoom nas colônias.....	44

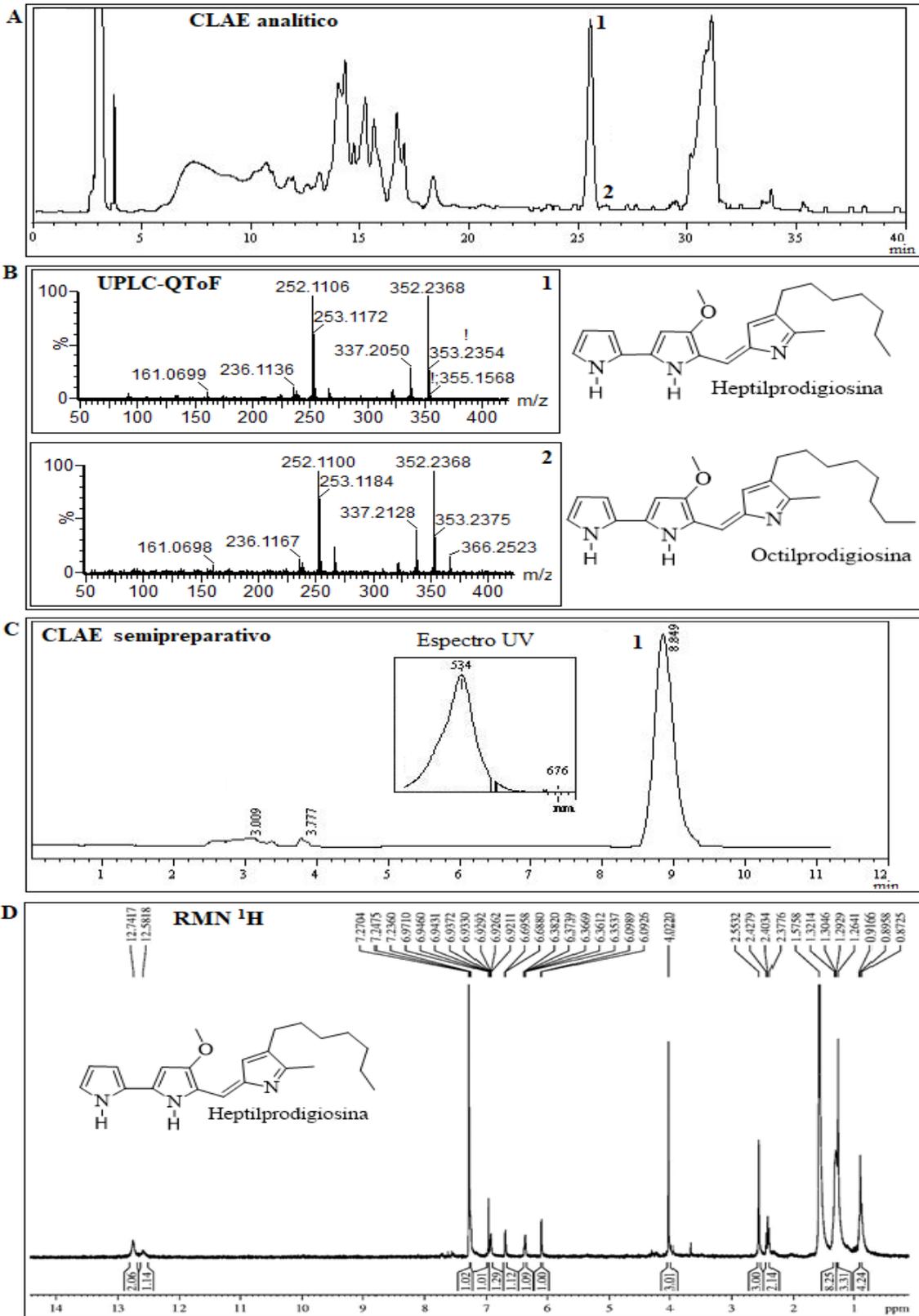
Figura 9 -	Gráfico de porcentagem de inibição da proliferação celular de extratos orgânicos por SRB (triagem).....	45
Figura 10 -	Gráfico da porcentagem de inibição do crescimento dos extratos orgânicos por SRB.	47
Figura 11 -	Imagem de BRA-612 em placa, do extrato após rotaevaporação e dos extratos orgânicos obtidos.....	48
Figura 12 -	Fórmula estrutural de heptilprodigiosina e fórmula estrutural de prodigiosina.....	49
Figura 13 -	Gráfico da porcentagem de inibição do crescimento celular dos compostos isolados do extrato de BRA-612 em HCT116.	50
Figura 14 -	Porcentagem de proliferação celular de heptilprodigiosina em células da linhagem B16-F10 em diferentes incubações.....	51
Figura 15 -	Imagem do gel de eletroforese com bandas amplificadas do DNA extraído de BRA-612 circuladas em vermelho.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Fonte de isolamento de método de processamento das 10 cepas isoladas.....	45
Tabela 2 -	Informações referentes às concentrações inibitórias médias, concentrações inibitórias totais e concentrações letais médias de heptilprodigiosina e prodigiosina contra células de HCT116.....	50
Tabela 3 -	Informações referentes às concentrações inibitórias médias, concentrações inibitórias totais e concentrações letais médias de heptilprodigiosina para os diferentes períodos de incubação.....	51

ANEXOS

ANEXO A



A – Cromatograma CLAE analítico do extrato AcOEt da BRA-612; **B** – Espectros de massas obtido por UPLC-QToF dos compostos heptilprodigosina (**1**) e octilprodigosina (**2**); **C** - Cromatograma CLAE semipreparativo de isolamento e **D** – Espectro RMN ^1H (300 MHz em CDCl_3) da heptilprodigosina.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de Etila
BaMBa	Brazilian Marine Biodiversity
BLAST	Basic Local Alignment Tool Search
CI ₅₀	Concentração inibitória média
CIT	Concentração inibitória total
CL ₅₀	Concentração letal média
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DOX	Doxorrubicina
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EMEA	Agência Europeia de Medicamentos
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCI	National Cancer Institute
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PNM	Produtos Naturais Marinhos
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPM	Rotações por minuto
SRB	Sulforodamina B
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
SWA	Sea Water Agar
TCA	Ácido tricloroacético
Tris	Hidroximetil aminometano
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Câncer.....	15
1.2 Biodiversidade marinha e Produtos Naturais Marinhos	17
1.3 Ascídias e microrganismos associados	21
2. JUSTIFICATIVA.....	25
3 OBJETIVOS.....	26
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 Planejamento experimental	27
4.2 Coleta do material	28
4.3. Meios de cultura	29
4.4 Processamento do material para isolamento de microrganismos cultiváveis	30
4.4.1 Extrato de ascídia.....	31
4.5 Isolamento dos microrganismos associados.....	32
4.6 Criopreservação dos microrganismos isolados.....	32
4.7. Obtenção dos extratos orgânicos	33
4.7.1 Extração dos cultivos em meio líquido.....	33
4.7.2 Extração dos cultivos em meio sólido	34
4.8. Cultura de linhagens celulares tumorais	34
4.9 Avaliação da atividade antiproliferativa <i>in vitro</i>	35
4.10 Fracionamento, purificação e identificação de compostos ativos.....	37
4.11 Identificação taxonômica da bactéria selecionada (BRA-612)	39
4.11.1 Extração de DNA por choque térmico.....	39
4.11.2 Reação em Cadeia da Polimerase	39
4.11.3 Eletroforese	40
4.11.4 Sequenciamento 16S	40

5 RESULTADOS	41
5.1 Isolamento de cepas bacterianas	41
5.1.1 Aspectos morfológicos.....	41
5.3 Extratos químicos	43
5.4 Avaliação da atividade antiproliferativa <i>in vitro</i>	43
5.5 Fracionamento, isolamento e identificação	45
5.6 Avaliação da atividade citotóxica dos compostos isolados e identificação dos compostos com atividade biológica	47
5.7 Identificação taxonômica	50
6. DISCUSSÃO.....	52
7. CONCLUSÕES.....	62
6. REFERÊNCIAS:	63

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

Câncer é a designação utilizada para caracterizar um conjunto amplo de doenças que têm em comum a proliferação celular anormal e a sua migração para outros tecidos ou órgãos (WHO, do inglês World Health Organization). Por representar a segunda principal causa de morte globalmente, o câncer se torna um alarmante problema de saúde pública, sendo necessário o desenvolvimento de novas terapias. Estima-se que diferentes tipos de câncer foram responsáveis por cerca de 9,6 milhões de mortes somente no ano de 2018, e o custo econômico anual em 2010 foi de cerca de U\$ 1,16 trilhões (WHO, 2018). No Brasil, em 2018, foram estimados cerca de 634.880 novos casos, sendo os tipos mais incidentes (excluindo pele não melanoma) o câncer de próstata e o câncer de mama (Instituto Nacional do Câncer, 2018).

Alguns fatores de risco são associados ao câncer, aumentando a susceptibilidade do indivíduo ao desenvolvimento de tumores. Por se tratar de uma doença crônica, o desenvolvimento do câncer pode ocorrer após exposição única ou contínua ao fator de risco específico. Entre esses fatores podem estar o tabagismo, a radiação ionizante, radiação solar e a obesidade (INCA, 2018).

A carcinogênese envolve o crescimento descontrolado de células após a ativação de oncogenes ou desativação de genes supressores tumorais. As mutações nessas duas classes de genes têm como resultado a progressão não regulada do ciclo celular e a inativação de mecanismos de apoptose (SARKAR *et al.*, 2013). O processo de carcinogênese tem sido dividido em três etapas: iniciação, promoção e progressão. Cada uma dessas etapas possui características moleculares e biológicas diferenciadas. Nas fases de iniciação e progressão são observadas mudanças herdáveis entre as células. Durante a promoção se observa uma alteração no perfil de expressão gênica nas células (PITOT, 1993).

A ocorrência da proliferação desordenada pode ocorrer em diversos tipos celulares, acarretando a existência de mais de centenas de tipos diferentes de câncer, variando em seus fenótipos e resposta à diferentes tipos de tratamento. Tumores benignos são aqueles que se confinam ao seu local original, enquanto tumores malignos possuem capacidade metastática e migram para diferentes tecidos e órgãos (COOPER, GM. *et al.*,2000). Por meio das mutações em genes-chave, as células adquirem instabilidade genética, possibilitando a geração de variabilidade genética, que é responsável por induzir as demais características carcinogênicas (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Na evolução de células normais para o estado neoplásico, ocorre a aquisição de algumas capacidades típicas do câncer. Hanahan e Weinberg (2011) elencaram essas marcas como características críticas no desenvolvimento de neoplasias. Dentre os *Hallmarks* (Figura 1, página 17) têm-se: manutenção da sinalização proliferativa, reprogramação do metabolismo, resistência à morte celular programada, instabilidade genética e mutações, angiogênese, invasão tecidual e metástase, geração do processo inflamatório, proliferação ilimitada, evasão do sistema imune e resistência a sinais antiproliferativos.

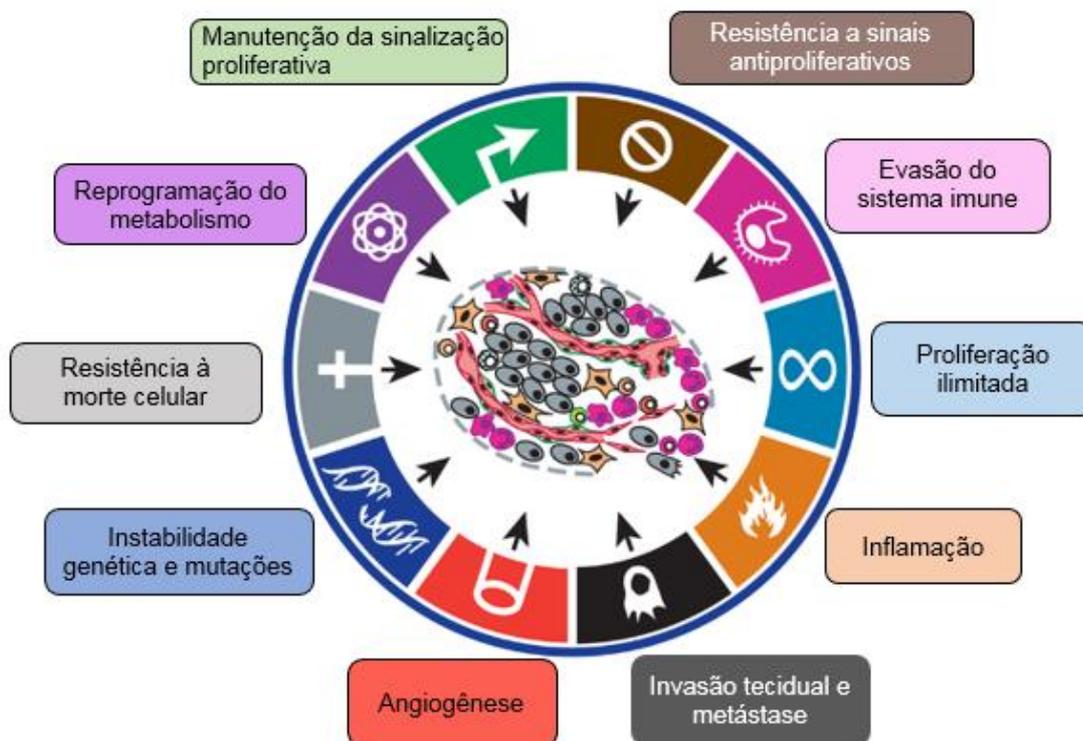


Figura 1: Capacidades adquiridas pelas células tumorais, denominadas de Hallmarks.

Fonte: Traduzido de HANAHAN & WEINBERG, 2011.

Intervenção cirúrgica, radiação e medicação são as principais formas de tratamento disponíveis atualmente (Mayo Clinic, 2019). Novas abordagens, como a imunoterapia e o estudo de diferentes vias de morte celular, têm se caracterizado como opções de terapias promissoras. Imunoterapia se refere a métodos de ativação do sistema imune para induzir respostas e estabilizar doenças (DRAKE; LIPSON; BRAHMER, 2014).

Apesar da grande diversidade de fármacos existentes para o tratamento de neoplasias, existem diversos efeitos colaterais associados à utilização de drogas citotóxicas convencionais, além da obtenção de resultados aquém do esperado. A utilização de drogas da classe das cisplatinas, por exemplo, é associada com a indução de neuropatia periférica, condição que limita o tratamento com esses quimioterápicos (QUASTHOFF; HARTUNG, 2002). Tratamentos baseados em fármacos da classe das antraciclinas (doxorubicina) têm sido associados a danos para as células do miocárdio em pacientes com câncer de mama. Ademais, há uma associação entre o aumento do risco de síndrome mielodisplásica e leucemia mieloide aguda secundária após tratamento prolongado com inibidores da Topoisomerase II (AZIM *et al.*, 2011). Dessa forma, a busca por novos fármacos com alvos mais específicos e que apresentem menos falha terapêutica e com efeitos colaterais manejáveis se faz necessária (JIMENEZ; WILKE; COSTA-LOTUFO, 2018). Esses fatores associados à quimioterapia enfatizam a importância da busca de novas fontes de moléculas anticâncer. Dessa forma, a diversidade química do ambiente marinho se torna uma fonte valiosa para a busca de novos fármacos (HAEFNER, 2003).

1.2 Biodiversidade marinha e Produtos Naturais Marinhos

A superfície terrestre é em sua maioria coberta por oceanos, sendo a vida terrestre originada nesse ambiente. Em alguns ecossistemas marinhos específicos como barreiras de coral, especula-se que a biodiversidade seja mais rica do que a de florestas tropicais (HAEFNER, 2003). Dessa forma, diante da necessidade de descoberta de novos compostos com atividade farmacológica, o ambiente marinho tem se caracterizado como uma fonte de diversidade química para a busca de novos fármacos (SIMMONS.; *et al.*,

2005). Produtos naturais em geral têm sido utilizados como fontes para a descoberta de fármacos, especialmente para o tratamento do câncer (PATRIDGE et al., 2016). Cerca de 80% dos fármacos anticâncer aprovados pelo Food and Drugs Administration, órgão regulatório dos Estados Unidos, advém de produtos naturais. Agentes quimioterápicos atualmente utilizados incluem o taxol, extraído de *Taxus brevifolia*, e os alcalóides vincristina e vinblastina, obtidos de *Vinca rosea* (BISHAYEE; SETHI, 2016).

Algumas características químicas dos produtos naturais justificam o interesse nesse tipo de moléculas em detrimento de moléculas sintéticas, como por exemplo, o alto número de centros quirais, estereocentros e ligações de hidrogênio (JIMENEZ et al., 2019). A eficácia de fármacos derivados de produtos naturais é comumente atribuída a sua organização tridimensional e propriedades estereoquímicas, oferecendo vantagens conformacionais na seletividade de alvos (YUAN et al., 2016). Embora suas conformações químicas favoreçam sua interação com alvos, a presença de estereoisômeros pode não ser desejável, já que alguns podem apresentar efeitos adversos severos ou baixa eficácia. (CALCATERRA; D'ACQUARICA, 2018). Em média, produtos naturais também possuem um conteúdo mais alto de carbono, hidrogênio e oxigênio e uma redução no conteúdo de nitrogênio. Ademais, outra característica é sua não complacência com a regra dos cinco de Lipinski para o desenvolvimento de fármacos, já que possuem massas superiores a 500 Da e altas polaridades (JIMENEZ et al., 2019).

Apesar de seu grande potencial, a Biotecnologia Marinha somente iniciou a despontar a partir da década de 70, sendo favorecida pelo desenvolvimento de novas tecnologias para a recuperação de amostras desse ambiente (FENICAL, 1997). Embora o estudo de produtos naturais marinhos (PNM) tenha iniciado na década de 70, foi observado o declínio do interesse e participação de indústrias farmacêuticas em durante a década de 90. A utilização de novas técnicas de análise como espectroscopia de ressonância magnética nuclear e *high-throughput screening* tem permitido o renascimento da biotecnologia marinha para o desenvolvimento de fármacos (MOLINSKI et al., 2009).

No Brasil, a biotecnologia marinha é um campo emergente, mas de grande potencial (**Figura 2**). Esta inclui a exploração de microrganismos marinhos, aquicultura, as ciências denominadas como ômicas, isolamento de compostos biologicamente ativos, entre outras aplicações (THOMPSON *et al.*, 2018).

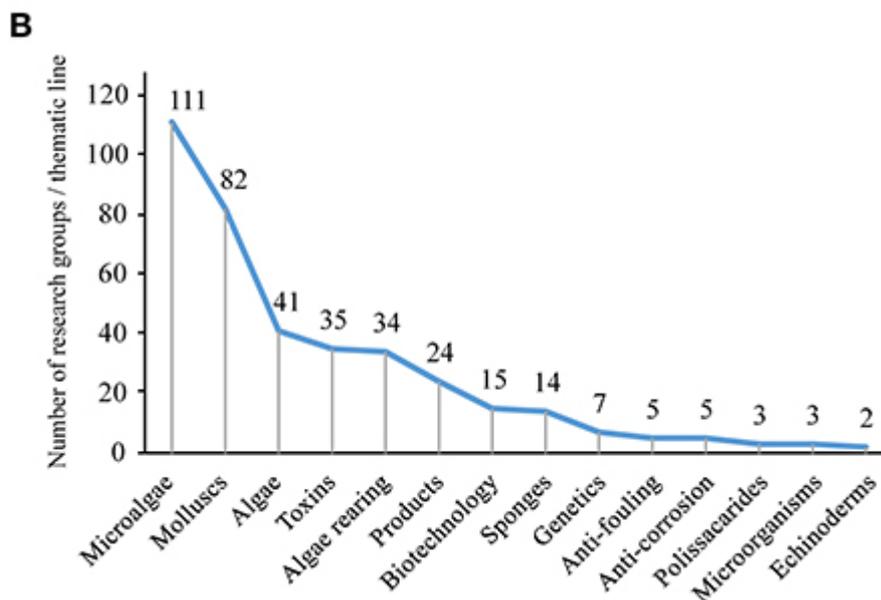


Figura 2: Distribuição dos interesses de grupos de pesquisa trabalhando com biotecnologia marinha no Brasil. Percebe-se a predominância de grupos de pesquisa com a temática de estudo de microalgas.

Fonte: Retirado de Marine Biotechnology in Brazil: Recent Developments and Its Potential for Innovation, de Thompson *et al.* 2018.

Diante do grande potencial químico e da rica composição do litoral brasileiro, esforços têm sido feitos para consolidar esse conhecimento, incluindo a criação do Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira (<https://sibbr.gov.br/>) pelo ministério de Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicações. Ademais, foi criado um banco de dados dedicado para informações sobre o ambiente marinho, BaMBa (MEIRELLES *et al.*, 2015). Essas iniciativas têm contribuído para disseminar o conteúdo da biodiversidade marinha brasileira e facilitar a utilização do conhecimento em abordagens de biotecnologia marinha (THOMPSON *et al.*, 2018).

Dentre as principais fontes da diversidade química marinha se encontram os invertebrados marinhos, caracterizando-se como os principais objetos de estudo

da Biotecnologia Marinha atual (BLUNT *et al.*, 2011). Metabólitos secundários, moléculas pequenas não envolvidas no metabolismo primário, são os principais tipos de compostos advindos de organismos marinhos. Macroalgas, esponjas, ascídias, corais e outros organismos sésseis têm se caracterizado como fontes interessantes para a descoberta de novos metabólitos (MARK HAY; FENICAL, 1996). Entre esses metabólitos secundários foram encontrados: terpenos, esteróis, policetídeos, peptídeos, alcaloides e porfirinas (RINEHART, 1992).

1.3 Ascídias e microrganismos associados

Ascídias são invertebrados marinhos bentônicos e filtradores, pertencentes ao subfilo Urochordata, com distribuição ampla no ambiente marinho. Sésseis na fase adulta, porém com fase larval móvel, apresentam aparente fragilidade fisiológica. Apesar de suas limitações fisiológicas, sua dominância geográfica sugere que esses organismos são eficientes competidores, produzindo defesas químicas contra predadores como uma forma de proteção (WATTERS, 2018). Suas características fisiológicas possuem algumas peculiaridades como a perda de estruturas relacionadas aos cordados durante a vida adulta, tecidos encapsulados por uma matriz de celulose e vacúolos preenchidos por ácido sulfúrico. Além desses fatores, algumas espécies são capazes de acumular metais como vanádio, cromo e molibdênio em suas células da hemolinfa (GOODBODY, 1975).

Os ambientes ocupados por esses invertebrados comumente exibem condições de estresse, como altos níveis de poluição (LAMBERT; LAMBERT, 2003), o que não tem demonstrado afetar sua ocupação do hábitat. Em longo prazo, a capacidade de ascídias de competirem por espaço e produzirem metabólitos alelopáticos (JACKSON; BUSS, 1975) as torna organismos dominantes no ambiente (EVANS *et al.*, 2017).

Embora a resistência de ascídias a predadores também seja atribuída à presença de uma túnica, sua predominância em ambientes ricos em predadores é fortemente relacionada ao arsenal de metabólitos produzidos como forma química de defesa (LÓPEZ-LEGENTIL; TURON; SCHUPP, 2006). Um exemplo é a produção de

peptídeos tóxicos, como os da classe das patelamidas encontradas em *Lissoclinum patella* (SCHMIDT *et al.*, 2005).

A produção de compostos tóxicos a predadores e competidores é comumente relacionada ao diverso microbioma associada às ascídias, apesar de estudos acerca da diversidade microbiana ainda serem incipientes quando comparados a outros organismos como corais e esponjas marinhas (CHEN *et al.*, 2018).

Embora o relacionamento entre ascídias e sua microbiota não esteja bem elucidado, os tunicados aparentam fornecer um ambiente protegido e rico em nutrientes. Dessa forma, a formação de uma microbiota diversa e abundante é favorecida (BAUERMEISTER *et al.*, 2019). Nesse contexto, é compreendido que o desenvolvimento do macrorganismo depende de comunidades microbianas complexas. Esse relacionamento entre organismo e sua microbiota resultou no termo holobionte, que descreve uma entidade biológica e seu simbiote (MARGULIS; FESTER, 1991). Atualmente, o termo holobionte se refere ao macrorganismo e as comunidades microbianas complexas que estão associadas a ele. Portanto, um hospedeiro e sua microbiota constituem um organismo holobionte (SIMON *et al.*, 2019).

Entre os sistemas estudados como holobiontes estão as ascídias e seus microrganismos associados. Porém, a dificuldade de cultivo da microbiota desses organismos dificulta o estudo de sua diversidade microbiana. Avanços em metagenômica tem permitido investigações mais profundas. Em geral, microrganismos associados a macrorganismos produzem compostos que podem ser utilizados por seus hospedeiros, especialmente em situações de defesa (BAUERMEISTER *et al.*, 2019).

Os microrganismos associados às ascídias têm sido relacionados como responsáveis por parte da diversidade química de metabólitos secundários encontrados nesses animais, apresentando papel-chave no sucesso ecológico desses invertebrados (SCHMIDT, 2015). A riqueza química dessas moléculas possui um

grande potencial farmacológico. Até o presente momento, mais de mil compostos diferentes foram descritos como isolados desse sistema holobionte (CARROLL *et al.*, 2019).

Diversos compostos produzidos por microrganismos associados à ascídias têm se mostrado ativos (CHEN *et al.*, 2018). O primeiro potencial fármaco extraído de tunicados foi o peptídeo Didemnina B, molécula com potencial antiviral e antitumoral. Os depsipeptídeos foram extraídos de uma ascídia pertencente ao gênero *Didemnidae* sp. em diferentes pontos de coleta no Caribe (RINEHART *et al.*, 1981). A Didemnina B foi o primeiro composto marinho a entrar na fase de estudos clínicos, mas por sua elevada toxicidade os ensaios foram descontinuados. Entretanto, um análogo da Didemnina B denominado de Plitidepsina tem demonstrado atividade anticâncer e se encontra em um estado avançado da fase clínica (WATTERS, 2018), tendo sido aprovado na Austrália em 2018 para o tratamento de mieloma múltiplo (PEREIRA *et al.*, 2019).

Um exemplo encontrado na clínica é a ecteinascidina 743 (ou trabectedina), comercializada pelo nome Yondelis, um fármaco anticâncer aprovado para o tratamento de sarcomas (RINEHART *et al.*, 1990), e que é produzido por *Candidatus Endoecteinascidia frumentensis*. Aprovado pela EMEA em 2007, a ecteinascidina também foi posteriormente aprovada para a utilização em câncer de ovário resistente a compostos platina. Dois derivados foram desenvolvidos, lurbectedina e Zalypsis[®], apresentando perfis citotóxicos similares à ecteinascidina. Ambas moléculas se encontram na fase de testes clínicos, lurbectedina para o tratamento de câncer de pulmão, mama, pâncreas, ovário e leucemias, e Zalypsis[®] para o tratamento de mielomas múltiplos e sarcoma de Ewing (PUYO; MONTAUDON; POURQUIER, 2014; GUO *et al.*, 2018; METAXAS *et al.*, 2018).

Moléculas de interesse farmacológico também foram encontradas em ascídias isoladas do litoral nordeste do Brasil. Uma espécie que apresenta proeminência em estudos é *Eudistoma vancouveri* (JIMENEZ *et al.*, 2008), possuindo diversas moléculas ativas, incluindo duas novas moléculas da classe das estauroporinas, alcalóides com atividade anticâncer (JIMENEZ *et al.*, 2012).

Outra espécie proeminente no litoral nordestino, porém pouco estudada é *Euherdmania* sp., uma ascídia pertencente à família *Euherdmaniidae* e encontrada em poças de maré, durante a maré baixa. Aparenta ser uma espécie endêmica da costa cearense, tendo sido encontrada inicialmente no Icapuí (LOTUFO, 2002). Sua atividade citotóxica foi inicialmente descrita por Jimenez, *et al.* 2003, utilizando-se o extrato hidroalcoólico da própria ascídia em ensaios de viabilidade celular. A predominância de ascídias no ambiente marinho é fortemente associada à produção de metabólitos de defesa (LÓPEZ-LEGENTIL; TURON; SCHUPP, 2006). A diversidade de compostos químicos encontrados em invertebrados marinhos tem sido relacionada com a presença de microrganismos simbiotes, que, ao se abrigarem no interior desses animais obtêm nutrientes e proteção do ambiente exterior (BAUERMEISTER *et al.*, 2019).

Extratos hidroalcoólicos da ascídia demonstraram citotoxicidade *in vitro* contra as linhagens de adenocarcinoma ileocecal e leucemia linfóide aguda, se caracterizando como uma fonte interessante para a busca de compostos bioativos (JIMENEZ *et al.*, 2003). Adicionalmente, os microrganismos associados à *Euherdmania* sp. tem se demonstrado uma fonte de metabólitos secundários citotóxicos. Alguns simbiotes foram identificados como pertencentes aos gêneros *Streptomyces* e *Pseudovibrio*, e, a partir de seus extratos, foram encontradas substâncias da classe de prodigiosinas, dicetopiperazinas e lipopeptídeos da classe das iturinas (FURTADO, 2016). Substâncias da classe das epóxi-cetonas foram isoladas de *Streptomyces* associada a *Euherdmania* sp., atuando como inibidores do proteassoma, um mecanismo relevante para o tratamento de gliomas (FURTADO, 2019). Dessa forma, a descoberta de moléculas com capacidade terapêutica para tipos de câncer mais agressivos e resistentes é bastante relevante.

Tais descobertas enfatizam o caráter profícuo da prospecção de moléculas a partir de microrganismos associados a invertebrados marinhos.

2 JUSTIFICATIVA

O câncer é uma grande problemática de saúde pública, e a busca de novos fármacos que possam preencher lacunas no arsenal quimioterápico às doenças formas mais agressivas que não respondem bem aos tratamentos existentes é uma necessidade real e urgente. Com um extenso litoral, o Brasil possui um grande potencial para a descoberta de novos fármacos baseados na megadiversidade da sua costa. A Amazônia Azul, território marítimo exclusivo do Brasil, possui cerca de 4,5 milhões de Km², sendo caracterizada como uma zona econômica exclusiva e com área comparável à da Amazônia legal (5,5 milhões de Km²).

Os produtos naturais marinhos têm se caracterizado como uma alternativa para a obtenção de novos fármacos, devido à sua diversidade. Microrganismos marinhos se caracterizam como uma fonte de diversas classes de metabólitos secundários citotóxicos que antes eram associados a animais marinhos. A utilização de microrganismos como fontes de compostos ativos é interessante tanto de um ponto de vista de redução de impactos ecológicos advindos da utilização de animais marinhos em larga escala, tanto quanto de redução de custos para a produção de fármacos, já que metabólitos secundários podem ser obtidos através de técnicas de fermentação (FENICAL; JENSEN, 2006).

Dos fármacos antineoplásicos presentes na clínica, existem quatro de origem marinha: citarabina (Cytosar[®]), trabectedina (Yondelis[®]), mesilato de eribulina (Halaven) e o anticorpo conjugado brentuximabe vedotina (Adcetris[®]). O isolamento desses fármacos ocorreu de esponjas, ascídias e moluscos, ressaltando a importância do estudo de invertebrados marinhos como novas fontes de fármacos.

O estudo do potencial anticâncer de moléculas produzidas por microrganismos associados à ascídia *Euherdmania* sp., encontrada na costa cearense, tem expectativas positivas uma vez que já existem relatos da capacidade farmacológica dos metabólitos secundários associados a esse invertebrado marinho.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Prospectar compostos com potencial anticâncer a partir de microrganismos associados à ascídia *Euherdmania* sp.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e cultivar microrganismos associados à ascídia *Euherdmania* sp. e ao sedimento associado ao animal coletados no litoral cearense;
- Obter extratos orgânicos das cepas isoladas;
- Avaliar a citotoxicidade contra células tumorais *in vitro* dos extratos obtidos;
- Determinar as melhores condições de cultivo das cepas selecionadas a fim de maximizar a produção do(s) composto(s) biologicamente ativo(s) presente(s) no(s) extrato(s);
- Realizar purificação química do(s) extrato(s) selecionado(s) utilizando diferentes técnicas cromatográficas, guiada pela atividade biológica;
- Caracterizar a estrutura química da(s) substância(s) isolada(s);
- Avaliar a citotoxicidade dos compostos ativos isolados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Planejamento experimental

O planejamento experimental deste trabalho consistiu inicialmente na coleta e processamento de *Euherdmania* sp., seguido do isolamento de cepas bacterianas associadas (Fig. 3A, página 29). As linhagens isoladas foram crescidas inicialmente em placa contendo meio ágar-água do mar (SWA, do inglês Sea Water Agar) e extrato nutritivo de ascídia. Posteriormente, as cepas foram crescidas em meio líquido, para criopreservação. Das cepas crescidas em meio sólido foi realizada a extração com acetato de etila (AcOEt) para obtenção de extratos orgânicos. Posteriormente, foram testados quanto à citotoxicidade em um ensaio de triagem com concentração única de amostra. A citotoxicidade dos extratos foi testada a partir do método de sulforodamina b (SRB). Os extratos ativos na triagem foram selecionados e submetidos ao SRB em um ensaio com curva de concentração, de forma a determinar a concentração inibitória para 50% das células (CI₅₀), concentração inibitória total (CIT), concentração letal média (CL₅₀) e assim comparar a potência entre os extratos. O extrato mais potente foi selecionado para a purificação e identificação dos compostos ativos por meio de fracionamento bioguiado através de diversas técnicas de química fina, tais como: espectrometria de massas e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A linhagem selecionada com atividade citotóxica mais potente foi identificada a partir de dados de sequenciamento de DNA.

A.



B.

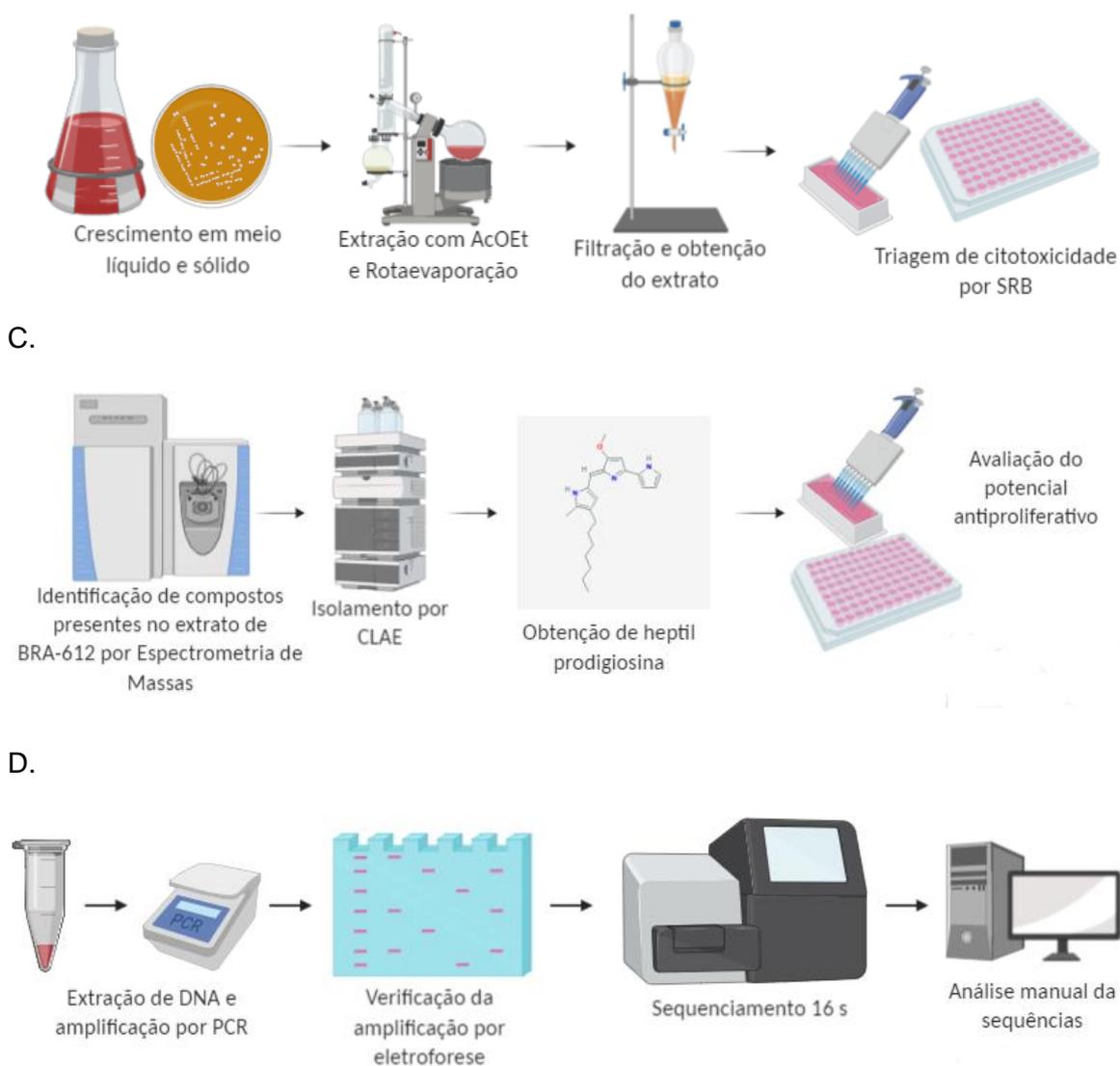


Figura 3: Ilustração contendo as etapas do planejamento experimental realizadas. A, obtenção dos microrganismos cultiváveis; B, Seleção de extratos ativos; C, Isolamento do(s) composto(s) ativo(s); e D, identificação da bactéria. O ensaio de viabilidade celular sulforodamina B, foi realizado em células tumorais de câncer de cólon humano da linhagem HCT116 para triagem de extratos ativos. A purificação e isolamento dos compostos foram guiados utilizando o ensaio de do SRB nas linhagens de HCT116 e B16-F10 (melanoma metastático murino). A identificação taxonômica foi realizada a partir da extração, amplificação e purificação de DNA referente à região 16S e posterior sequenciamento. Fonte: Elaborada pela autora.

4.2 Coleta do material

A ascídia *Euherdmania* sp. foi coletada na praia da Taíba, município de São Gonçalo do Amarante, Ceará, com ponto de coleta (Figura 4) delimitado pelas

seguintes coordenadas 3°30'22" S; 38°53'28" O. O número de autorização da coleta de material biológico da SISBIO é 48522-1. As bactérias isoladas também foram cadastradas no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), de acordo com a Portaria SECEX/CGEN nº 1. o número de cadastro no SisGen é AC0781C. Após a coleta foi realizada a limpeza externa do animal, que teve o sedimento associado removido e armazenado em falcon de 50 mL estéril, e em seguida processado para o cultivo de microrganismos. O invertebrado foi então lavado com água estéril, borrifado com álcool 70% (v/v) para retirada de eventuais contaminantes remanescentes, novamente lavado com água do mar estéril e acondicionado em falcon de 50 mL estéril.

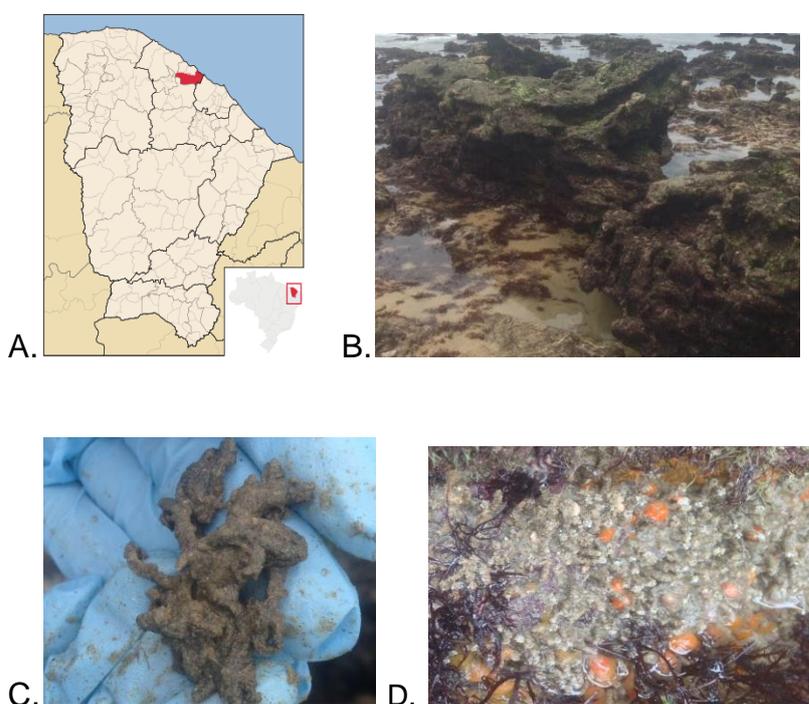


Figura 4: **A.** Localização do município de São Gonçalo do Amarante – CE; **B.** Local de coleta da ascídia *Euherdmania* sp., de acordo com as coordenadas 3°30'22" S; 38°53'28" O. **C.** Ascídia *Euherdmania* sp., do subfiló Urochordata, encontrada na encosta de rochas durante a maré baixa; **D.** Ascídia *Euherdmania* sp. na poça de maré em que ocorreu a coleta.

Fonte: Arquivo pessoal da autora.

4.3. Meios de cultura

Para o isolamento de microrganismos foram preparadas placas de Petri contendo meio sólido. No momento inicial, as amostras foram plaqueadas em meio Sea Water Agar (descrito abaixo) com a suplementação de extrato de ascídia. Essa suplementação foi realizada para maximizar a obtenção de microrganismos de *Euherdmania* sp., já que a composição do extrato deve ser semelhante nutricionalmente ao ambiente interno da ascídia. Os meios líquidos foram utilizados para o crescimento destinado a criopreservação. Ambos os cultivos de meio sólido e líquido foram utilizados na produção de extratos orgânicos.

SWA (Sea Water Agar): 18 g de Agar foram dissolvidos em 1 L água do mar filtrada e 75% em dH₂O. Foi adicionado ao meio SWA o extrato de ascídia (macerado). Todos os meios de cultura passam por esterilização em autoclave à 121°C por 15 minutos. Os meios de cultura ágar foram suplementados com ciclohexamida (Sigma) 100µg/ml.

Meio A1 sólido: 18 g de ágar, 10 g de amido, 2 g de Peptona, 4 g de extrato de Levedura foram dissolvidos em 1L de água do mar filtrada e 75% em dH₂O. O Meio A1 sólido foi utilizado para o isolamento dos microrganismos identificados após o processamento, crescimento em placa e extração sólida.

Meio A1 líquido: 10 g de amido, 2 g de Peptona, 4 g de extrato de Levedura e foram dissolvidos em 1L de água do mar filtrada e 75% em dH₂O. Este foi o meio utilizado para extração líquida.

4.4 Processamento do material para isolamento de microrganismos cultiváveis

O material coletado foi processado no Laboratório de Bioprospecção de Biotecnologia Marinha do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (Porangabuçu) da Universidade Federal do Ceará. Dentro de uma câmara de fluxo unidirecional (Filtracom Mini Flow I), as ascídias foram trituradas com tesoura até

formarem uma pasta densa, que seguiu para banho seco aquecido a 56°C por 10 minutos e posterior incubação em placas de ágar contendo meios de cultura favoráveis ao crescimento de actinomicetos (SWA contendo o extrato de ascídia, descrito a seguir), através da técnica de esgotamento por estrias. O processamento dos sedimentos se deu através do método do carimbo (M1) e do método de diluição com esgotamento por estrias (M2). Em M1 foi recolhido o sedimento que se depositou no fundo do falcon e o sedimento foi disposto em placas vazias e estéreis até a secagem do material (aproximadamente duas horas), após a secagem o material foi colocado nas placas através de esponjas estéreis. Em M2 foi recolhida uma alíquota de 500 μL da amostra líquida do sedimento que posteriormente foi levada ao banho seco aquecido a 56°C por 10 minutos. Para a preparação do extrato de ascídia, o animal coletado foi cortado com tesoura estéril e macerado com pistilo em um cadinho até a formação de uma pasta densa. A essa pasta foi adicionada água estéril até a formação de um caldo que foi filtrado em filtro de papel 0,22 μM e posteriormente em filtro 0,22 μM acoplado à bomba de vácuo. O extrato obtido foi pipetado (200 μL) em placas de Petri contendo meio de cultura e espalhado com o auxílio de uma alça de Drigalski estéril. Após a secagem do extrato, as amostras foram estriadas nas placas. Utilizando uma alça estéril o material foi incubado em placas de ágar contendo meios de cultura favoráveis ao crescimento de actinomicetos, através da técnica de esgotamento por estrias.

4.4.1 Extrato de ascídia

Após a obtenção do animal, foi realizada a limpeza de epibiontes macroscópicos ainda no local de coleta. No laboratório foram pesados aproximadamente 10 gramas das ascídias separadas para extrato. O material foi colocado num cadinho e triturado de forma inicial com tesoura e pinça cirúrgica estéreis (Figura 5). Após a trituração inicial foram acrescentados aproximadamente 100 mL de água do mar estéril ao cadinho. Em seguida o material foi macerado com o pistilo até a formação do extrato. Posteriormente o material foi filtrado com um filtro descartável em um funil, esse procedimento foi realizado até que no líquido não

tivesse a presença de sedimentos ou partes do animal. Em seguida foi realizada filtração na bomba de vácuo, de forma a tornar o extrato estéril. O extrato foi levado ao fluxo, pipetado e espalhado (200 µL para cada placa) com uma alça de Drigalski (estéril). Após a secagem das placas foi realizado o processamento do material coletado.



Figura 5: Trituração inicial de *Euherdmania* sp. com tesoura e bisturi cirúrgico para preparação do extrato de ascídia utilizado como suplementação do meio de cultura.

Fonte: Arquivo pessoal da autora.

4.5 Isolamento dos microrganismos associados

As placas de ágar ficaram sob observação por até três meses após processamento. O aparecimento de novas colônias foi monitorado diariamente. As colônias foram reconhecidas por suas diferenças morfológicas (cor, brilho, textura, etc) analisadas em lupa e separadas/purificadas em meio A1 sólido.

4.6 Criopreservação dos microrganismos isolados

Após o isolamento das colônias, as cepas isoladas foram crescidas em 100 mL de meio A1 líquido e permaneceram em agitação constante em agitador orbital (~120 rpm) por 7 dias. Ao fim deste período, uma alíquota de 10 mL do caldo da cultura foi separada e distribuída entre 9 frascos criogênicos com capacidade de 2 mL

contendo glicerol diluído 50% em dH₂O estéril (1:1). Os frascos foram congelados em freezer a -70°C. Todas as cepas isoladas de *Euherdmania* sp. foram catalogadas (BRA-XXX) e depositadas no banco de bactérias do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia Marinha, MicroMarin (www.labbmar.ufc.br/micromarin).

4.7. Obtenção dos extratos orgânicos

O planejamento experimental para a obtenção dos extratos foi realizado como ilustrado (Figura 6) abaixo.

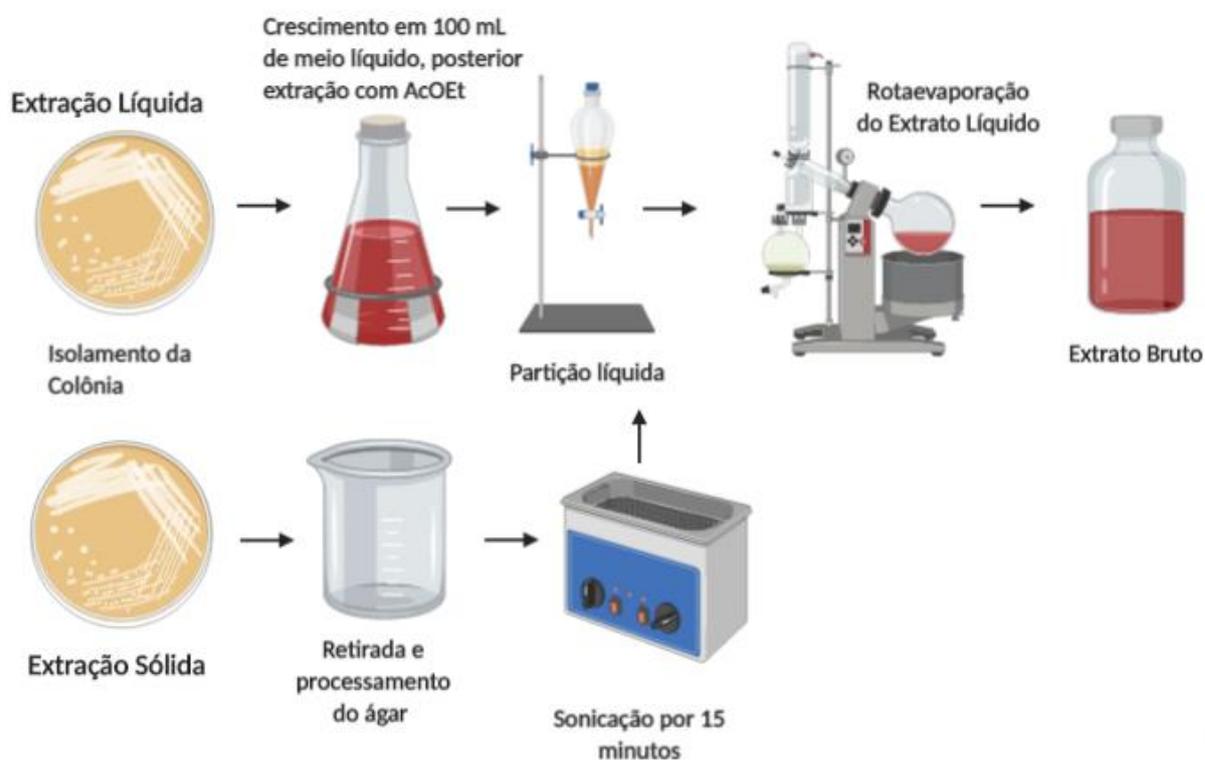


Figura 6: Fluxograma geral da metodologia de extração líquida e sólida.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.7.1 Extração dos cultivos em meio líquido

Os extratos das cepas bacterianas isoladas foram obtidos por meio do cultivo em 100 mL de meio A1 líquido por um período de 5 a 7 dias em agitação constante em agitador orbital (~120 rpm). A extração foi realizada com o solvente AcOEt, em proporção de 1:1 (cultura bacteriana:solvente). Após o acréscimo do

solvente o material retornou para agitação constante por cerca de uma hora (~60 rpm). Posteriormente, a separação das diferentes fases ocorreu em capela de fluxo laminar com o auxílio de funil de separação. Por fim, o excesso de água da fase contendo o solvente foi removido com sulfato de sódio, e concentrado através de rotaevaporação, seguido de secagem *overnight* à temperatura ambiente em capela de fluxo. Os extratos foram armazenados em congelador (-20°C).

4.7.2 Extração dos cultivos em meio sólido

O cultivo em meio A1 sólido para a extração foi iniciado pelo método de espalhamento com alça de Drigalski, com 200 μ L da solução bacteriana em meio de cultura líquido aplicada na placa de Petri contendo meio A1 (dimensão de 21 cm). Após cultivo por 5 a 7 dias, o material sólido foi removido da placa e cortado com o auxílio de uma espátula e transferido para um béquer. O solvente AcOEt foi aplicado até ocorrer a cobertura do material sólido e sonicado por 20 minutos. Por fim, separou-se a fase líquida da fase sólida com o auxílio de funil de separação quando foi possível observar separação de fases. Para maximizar a recuperação de metabólitos secundários, posteriormente foi utilizado o solvente metanol. A metodologia empregada foi semelhante à utilizada com AcOEt. A fase contendo o solvente foi concentrada através de rotaevaporação e a secagem final *overnight* à temperatura ambiente em capela de fluxo laminar para posterior armazenamento em freezer (-20°C).

4.8. Cultura de linhagens celulares tumorais

As linhagens celulares de câncer colorretal (HCT116) e melanoma murinho metastático (B16-F10) foram utilizadas para a realização dos experimentos da atividade antiproliferativa. O cultivo celular foi realizado em frascos plásticos para cultura (Sarstedt, 25 cm², volume de 50 mL ou 75 cm², volume de 250 mL) utilizando o meio de cultura DMEM (Difco) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado

e 1% de antibióticos (100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina). O manuseio da linhagem HCT-116 foi realizado em câmara de fluxo laminar vertical (ESCO, modelo Airstream classe II-B2; VECO, modelo Biosafe 12 classe II) e a cultura foi mantida em incubadora de CO₂ a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ (SANYO, modelo MCO-19AIC; NUAIRE, modelo TS Autoflow). O crescimento celular foi acompanhado diariamente com auxílio de microscópio óptico invertido (LABOMED, modelo TCM 400; Nikon, modelo Diaphot) e a manutenção para meio de cultura novo foi realizada duas vezes por semana, respeitando o limite máximo de 70% de confluência. As células aderidas foram desprendidas como auxílio de uma solução de tripsina-EDTA 0,5% (Gibco) diluída 10X em PBS.

4.9 Avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro*

O potencial anticâncer dos extratos orgânicos foi avaliado contra a linhagem de células tumorais HCT116 (câncer colorretal humano) através do ensaio da sulforodamina B (SRB). As substâncias isoladas a partir do fracionamento bioguiado dos extratos tiveram atividade antiproliferativa testada contra HCT116 (Figura 7, página 39) e linhagem de B16-F10 (melanoma murino). O método de SRB é um método colorimétrico indireto para a determinação de densidade celular baseado no teor de proteínas total.

O ensaio de SRB foi descrito inicialmente em 1990 por Skehan e colaboradores (SKEHAN *et al.*, 1990) como um novo método indireto para screening de fármacos anticâncer. A medida de densidade celular é possível devido à capacidade do SRB de se ligar à resíduos de aminoácidos básicos em condições levemente ácidas. A reação ocorre de forma estequiométrica, ou seja, a ligação do composto depende da massa de células presente. Por sua rapidez, baixo custo, independência do metabolismo celular e sensibilidade, o ensaio de SRB tem sido utilizado como ferramenta para *screening* de fármacos (VICHAI; KIRTIKARA, 2006).

Primeiro foi realizado o plaqueamento das células na concentração de 30.000 células/poço. Além da placa de teste, foi preparada uma placa para obtenção do referencial relativo à quantidade de células no momento do início da incubação

com os extratos, chamada de placa Tempo Zero, nela nenhuma amostra é incubada. As amostras correspondentes aos extratos foram adicionadas, após 24 horas do plaqueamento das células (37°C, CO₂ 5%), na concentração de 50 µg/mL em triplicata e incubadas por 72 horas. O controle negativo DMSO e o controle positivo DOX também foram adicionados na mesma concentração e após o mesmo período. Substâncias isoladas foram testadas nas concentrações de 0,016 a 50 µg/mL, em triplicata, contra linhagens de HCT 116 e B16-F10 também por 72 horas. Além da incubação em 72 horas, as moléculas isoladas também foram testadas com 24 e 48 horas de incubação contra a linhagem B16-F10.

O Tempo Zero foi fixado com 100 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% e armazenado a 4°C imediatamente antes do início do tratamento das demais placas. Após 72 horas de incubação, as placas de teste também foram fixadas com TCA e armazenadas a 4°C durante no mínimo 1 hora. Após o período de incubação foram realizadas 3 lavagens com água destilada (200 µL) e posterior secagem das placas. Em seguida foi adicionado o SRB 0,4% (100 µL) e as placas foram incubadas por 30 minutos. Após esse período o SRB foi removido e as placas foram lavadas 3 vezes com 200 µL de ácido acético. Após a remoção do ácido acético foi adicionado o tampão Tris Base 10 mM (200 µL) e as placas foram agitadas em agitador orbital (70 rpm) por 10 minutos.

As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 570 nm. Os extratos com atividade superior ou equivalente a 75% de inibição do crescimento foram considerados ativos e submetidos ao experimento para cálculo da curva e de parâmetros de concentração inibitória contra a mesma linhagem celular e mesmo período (72 horas). Além dos extratos, o ensaio de curva foi realizado também com as frações e substâncias isoladas.

A partir da obtenção das leituras de absorbância os dados foram normalizados utilizando o software Excel 2016. Inicialmente o valor de leitura correspondente ao branco foi removido de todas as leituras. Foi obtido o valor da média do Tempo Zero e do controle negativo (DMSO). Repetições cuja leitura foi superior à média do Tempo Zero foram consideradas como citostáticas e

normalizadas de acordo com a fórmula: % de inibição do crescimento = $100 - \frac{\text{leitura da amostra} - \text{média do Tempo Zero}}{\text{média do controle negativo} - \text{média do Tempo Zero}} \times 100$. Já para as repetições cujo valor de leitura foi inferior ou igual à leitura do Tempo Zero foi utilizada a seguinte fórmula: % de células mortas = $100 - \frac{\text{leitura da amostra}}{\text{média do Tempo Zero}} \times 100$. A partir da normalização das leituras, os valores foram adicionados ao software GraphPad Prism 7. Foram obtidos gráficos de porcentagem de inibição do crescimento celular. Os dados também foram utilizados para a obtenção de concentração inibitória média (CI₅₀), concentração inibitória total (CIT) e concentração letal média (CL₅₀) a partir de interpolação de regressão não-linear utilizando a função semilog-line.

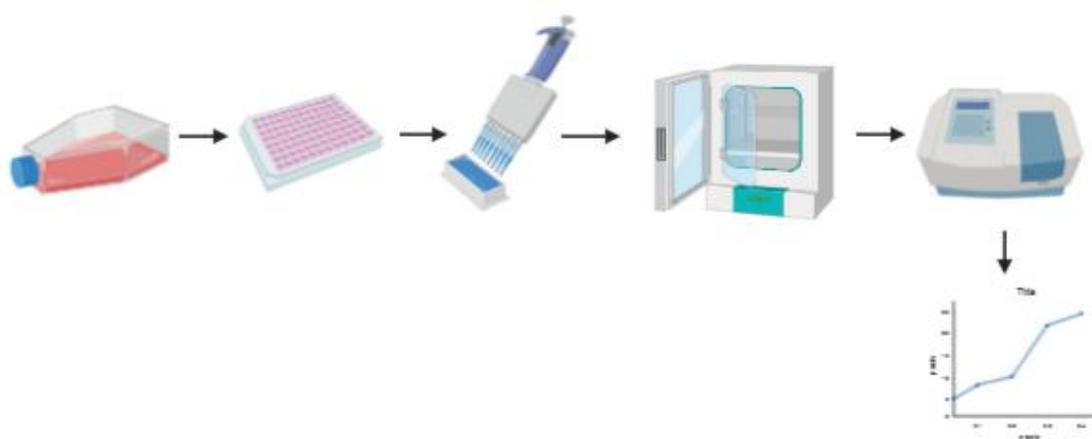


Figura 7: Figura ilustrando o fluxo de trabalho para realização do ensaio de sulforhodamina B. Inicialmente as células foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas. As amostras adicionadas aos poços contendo as células e incubadas por 72 horas. Após o período de incubação é realizada a leitura utilizando espectrofotômetro e os dados são analisados via GraphPad Prism 7.0.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.10 Fracionamento, purificação e identificação de compostos ativos

Após a realização de ensaio antiproliferativo com SRB 72 horas em linhagens tumorais HCT116, o extrato que apresentou maior atividade teve seu perfil de metabólitos secundários estudado para a identificação de compostos ativos. Inicialmente, foi utilizada espectrometria de massas para a identificação de moléculas presentes na amostra estudada, para posterior isolamento e purificação.

As extrações químicas foram realizadas em parceria com a Prof. Dr. Otília Pessoa e seu colaborador Dr. Francisco das Chagas Lima Pinto no Laboratório de Análise Fitoquímica de Plantas Medicinais (LAFIPLAM II) da Universidade Federal do Ceará. Os extratos obtidos foram utilizados no ensaio de SRB para guiar a purificação e identificação de compostos com atividade biológica.

O extrato orgânico que apresentou maior potência foi enviado para análise de composição por meio de espectrometria de massas, em parceria com o Dr. Kirley Marques Canuto, do Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais localizado na Embrapa Agroindústria Tropical (Campus do Pici - Universidade Federal do Ceará), e com o auxílio de seu colaborador Dr. Paulo Ricelli Vasconcelos Ribeiro.

Os extratos obtidos da amostra que apresentou maior potência foram injetados em equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em coluna analítica. O equipamento utilizado está localizado no Laboratório de Análise Fitoquímica de Plantas Medicinais (LAFIPLAM II) da Universidade Federal do Ceará, e a análise foi realizada em parceria com a Profa. Dra. Otília Pessoa e seu colaborador Dr. Francisco das Chagas Lima Pinto.

Após a utilização do CLAE para identificação de moléculas no extrato, foi realizada a purificação por cromatografia em coluna de sílica. Foram utilizadas 4 placas de Petri (cada uma com volume aproximado de 30 mL) totalizando 51 mg de extrato orgânico. A coluna foi montada com proporção de 1:10 entre adsorvato e adsorvente. O eluente utilizado foi Hexano Acetato, inicialmente na proporção de 2:1 sendo utilizado 100 mL. Posteriormente foi utilizado Hexano Acetato na proporção de 1:1, volume de 100 mL. Para a limpeza da coluna foi utilizado Acetato e Metanol na proporção de 1:1. Para remover demais impurezas utilizou-se uma coluna com SEPHADEX, um gel de dextrana em ligações cruzadas. Ao variar o grau de ligações cruzadas, as propriedades de separação do gel podem ser alteradas, permitindo o fracionamento de moléculas com diferentes pesos moleculares. Foi utilizado SEPHADEX LH20 com coluna de 30 cm de altura e 1 cm de diâmetro. A eluição foi realizada com Metanol e Dicloro-Metano na proporção 8:2.

4.11 Identificação taxonômica da bactéria selecionada (BRA-612)

Para a realização da identificação taxonômica foi obtido o DNA total da cepa BRA-612 através da metodologia de choque térmico, amplificado por Polymerase Chain Reaction *in vitro* (PCR). A verificação da amplificação dos fragmentos foi realizada por meio de eletroforese com gel de agarose. Após a confirmação da amplificação, o produto de PCR foi submetido ao sequenciamento do gene rRNA 16 S. A análise dos resultados obtidos foi realizada utilizando o software Geneious R10. Por meio desse software as sequências foram visualizadas e editadas manualmente. Após essa etapa, a sequência contig gerada foi comparada com outras sequências nucleotídicas cadastradas no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI). A análise foi realizada por meio da ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

4.11.1 Extração de DNA por choque térmico

O método de choque térmico se baseia na variação brusca de temperatura, de forma a romper a membrana celular e extravasar o conteúdo de DNA. 1 mL da cultura líquida foi colocado em microtubo e posteriormente centrifugado a 10 mil rotações por minuto (RPM) por cinco minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido em 300 µL de água deionizada estéril. Os microtubos foram colocados em um flutuador e então no banho-maria com temperatura de 100°C durante 10 minutos. Ao término desse período, a estante flutuadora foi colocada em um isopor contendo gelo durante 10 minutos. Por fim, a estante flutuadora foi colocada novamente no banho-maria a 100°C por 10 minutos.

4.11.2 Reação em Cadeia da Polimerase

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*) é uma técnica utilizada para a amplificação de DNA *in vitro*, a partir da utilização de uma enzima polimerase termorresistente. Conforme descrito por Kary Mullis em 1983, o procedimento ocorre em três etapas:

1. Desnaturação das fitas de DNA da amostra
2. Anelamento dos primers às fitas únicas de DNA
3. Extensão, em que a fita molde será replicada

Essas etapas serão repetidas até que se decorra o tempo final da reação programada no termociclador, de forma a se obter a quantidade de DNA desejável. Para a reação de amplificação, foram utilizados primers universais para a região do gene 16S rDNA: 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1494R (5'ACGGCTACCTTGTACGACTT-3') (HEUER *et al.*, 1997). Para a preparação da reação foi utilizado um volume de 25 mL contendo: 5 µL de goTaq Green 5X (Promega), 0,5 µL de dNTPs (10 mM), 1,0 µL de cada primer (10 µM), 0,125 µL taq polimerase (5U/1µL), 1 µL de DNA (10-100 ng) e água deionizada estéril para completar o volume de reação. Para a amplificação da reação foi utilizado o termociclador C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad), seguindo protocolo com desnaturação inicial a 95°C por três minutos, seguido por 32 ciclos de: desnaturação inicial a 95°C por trinta segundos, anelamento a 54,8°C por trinta segundos e extensão a 72°C por um minuto, e por fim, a extensão final a 72°C durante cinco minutos.

4.11.3 Eletroforese

O produto de PCR foi corado com SYBR Safe DNA Gel Stain (Life Technologies) para a visualização em gel de agarose 1%. A corrida foi realizada a 80V e 40 mA por quarenta minutos, utilizando como tampão o Tris-Borato (TBE 0,5X). A visualização do gel foi efetuada através do Molecular Image Gel Doc™ XR+ (Bio-Rad).

4.11.4 Sequenciamento 16S

O produto de PCR amplificado foi purificado por meio da precipitação por acetato de sódio e etanol, em parceria com o Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (Lembitech), coordenado pela Prof. Dra. Vânia Maria Maciel Melo.

Às amostras de DNA extraído foi adicionado acetato de potássio a 3 M, de forma a obter concentração final de 0,3 M. Em seguida, foram adicionados dois volumes (do volume total) de Etanol 100%. A solução foi homogeneizada por inversão. Após essa etapa a solução foi refrigerada em freezer -80°C por trinta minutos. Posterior à refrigeração, a amostra foi centrifugada a 15.000 G, 4°C, por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com Etanol 70%. Após a lavagem, a solução foi novamente centrifugada a 10.000 G, a 4°C, por 5 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado, a amostra foi levada para secar no Thermomixer Compact (Eppendorf®). A solução foi ressuspensa em água ultrapura.

A quantificação do DNA foi realizada em nanodrop. A amostra foi enviada para sequenciamento na MacroGen utilizando os primers 27F; 518F; 800R e 1492R. Análise e edição da sequência obtida foi realizada por meio da ferramenta Geneious R10. A identificação de gênero foi realizada a partir da inserção da sequência consenso obtida no BLAST nucleotide. Os primeiros *hits* foram considerados como mais semelhantes por meio da observação de valores de *query cover*, *e-value* e identidade.

5 RESULTADOS

5.1 Isolamento de cepas bacterianas

Foram recuperadas 10 cepas a partir do processamento realizado com meio SWA e extrato de ascídia. Após o processamento inicial, foram isoladas e crescidas em meio líquido, criopreservadas e posteriormente identificadas no banco de dados MicroMarin (disponível em: www.labmar.ufc.br/micromarinbr). As cepas obtidas nesse trabalho foram: BRA-612, BRA-613, BRA-614, BRA-615, BRA-616, BRA-623, BRA-624, BRA-625, BRA-631 e BRA-632.

5.1.1 Aspectos morfológicos

Foram obtidas 10 cepas, isoladas a partir de suas características morfológicas observadas em lupa (Figura 8).

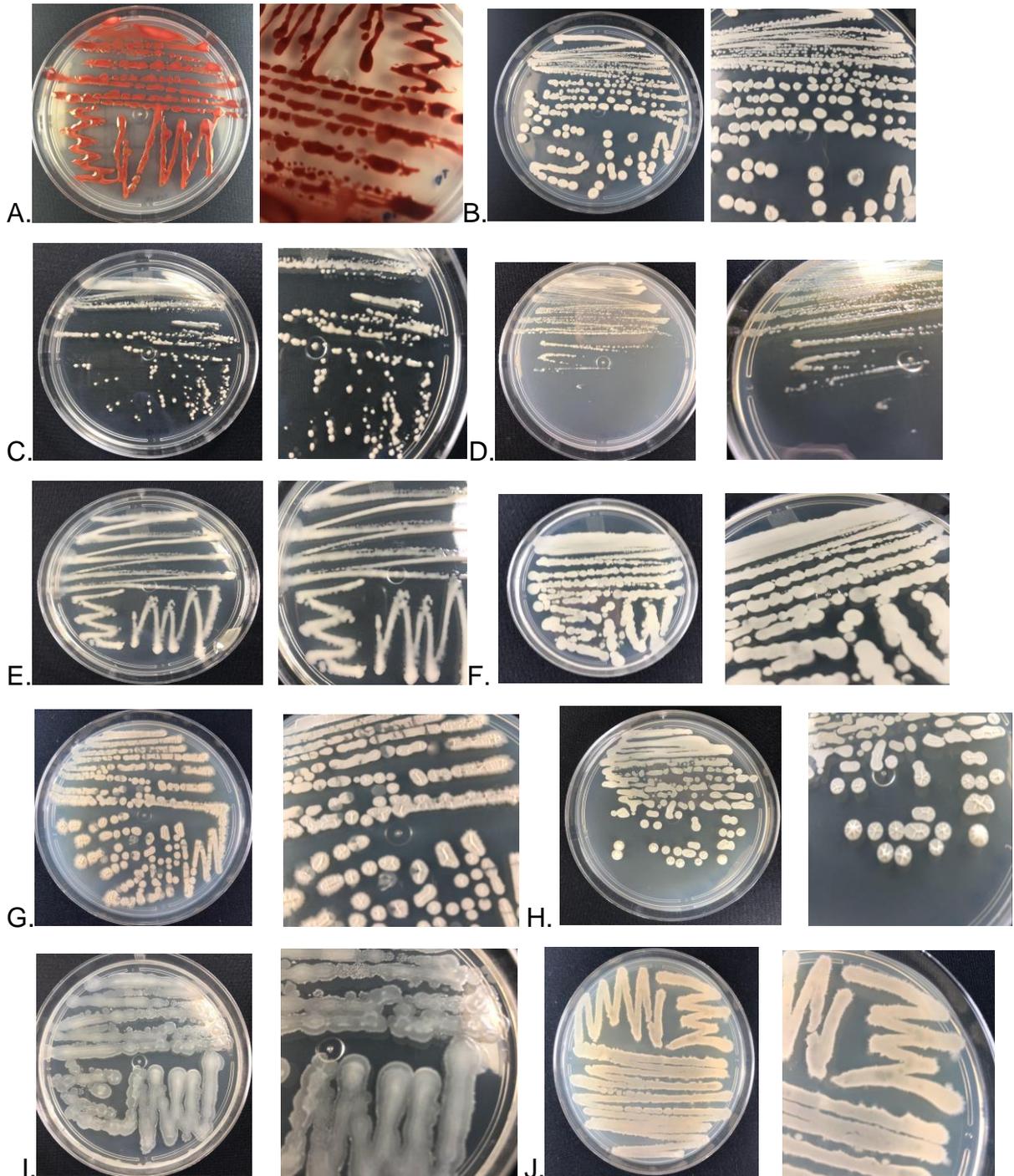


Figura 8: Fotos de algumas das placas de cepas bacterianas isoladas. As fotos foram retiradas de placa inteira e aproximando para visualizar colônias. Respectivamente da esquerda para a direita: BRA-612 (A.), BRA-613 (B.), BRA-614 (C.), BRA-615 (D.), BRA-616 (E.), BRA-623 (F.), BRA-624 (G.), BRA-625 (H.) BRA-631 (I.), BRA-632 (J.).

Fonte: Arquivo pessoal da autora.

As fontes de cada uma das cepas isoladas foram discriminadas na tabela abaixo (Tabela 1).

BRA-XXX depositada	Fonte de Isolamento
BRA-612	Sedimento, M1
BRA-613	Sedimento, M2
BRA-614	Sedimento, M2
BRA-615	<i>Euherdmania</i> sp.
BRA-616	<i>Euherdmania</i> sp.
BRA-623	Sedimento, M1
BRA-624	<i>Euherdmania</i> sp.
BRA-625	<i>Euherdmania</i> sp.
BRA-631	Sedimento, M2
BRA-632	<i>Euherdmania</i> sp.

Tabela 1: Fonte de isolamento de método de processamento das 10 cepas isoladas.

Por meio dos dados da tabela 1, é possível perceber que foi obtido o mesmo número de cepas para as duas fontes de material utilizadas no processamento.

5.3 Extratos químicos

Foram obtidos extratos químicos tanto do cultivo por meio líquido, quanto por cultivo em meio sólido. Foram obtidos cinco extratos em meio líquido referentes à: BRA-612, BRA-613, BRA-614, BRA-615 e BRA-616. Os extratos sólidos foram obtidos para todas as cepas isoladas, totalizando dez extratos. Observou-se que, em meio sólido a utilização do solvente AcOEt era reduzida sem comprometimento do rendimento, portanto, para o restante do trabalho foi utilizada a extração em meio sólido.

5.4 Avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro*

A partir da obtenção dos extratos de meio sólido foi realizado o ensaio de triagem por meio da metodologia de SRB. Amostras que apresentaram inibição de proliferação acima de 75% (Figura 9, página 39) foram selecionadas para a realização

do ensaio em curva. O limite de 75% é uma escolha arbitrária praticada para permitir a seleção de extratos em que a molécula ativa esteja em menor porcentagem.

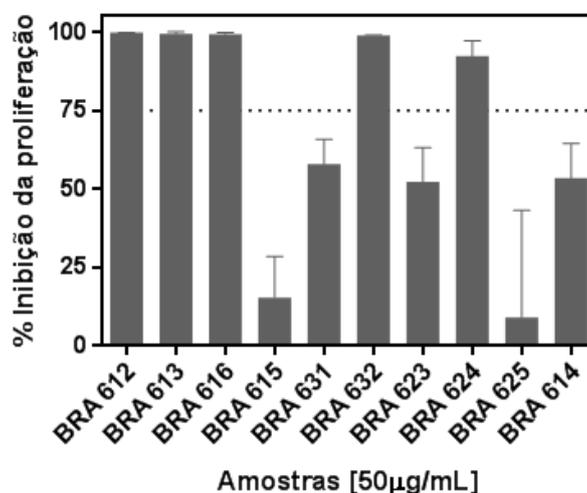


Figura 9: Avaliação da porcentagem de inibição da proliferação celular por SBR. As amostras testadas foram os extratos de bactérias associadas à *Euherdmania* sp. A linha tracejada representa o limiar de 75%. O ensaio foi conduzido com a concentração única de 50 µg/mL e em triplicata.

Através da triagem, foram encontrados 5 extratos considerados ativos, do total de 10 testados, indicando o alto potencial anticâncer apresentado pelos microrganismos isolados. Os extratos que apresentaram inibição da proliferação celular superior a 75% (BRA-612, BRA-613, BRA-616, BRA-632 e BRA-624) foram selecionados para a realização do ensaio em curva.

A partir do ensaio de triagem, foi realizado um ensaio de curva para a obtenção dos valores de CI_{50} , CIT e CL_{50} dos extratos (Figura 10, página 47).

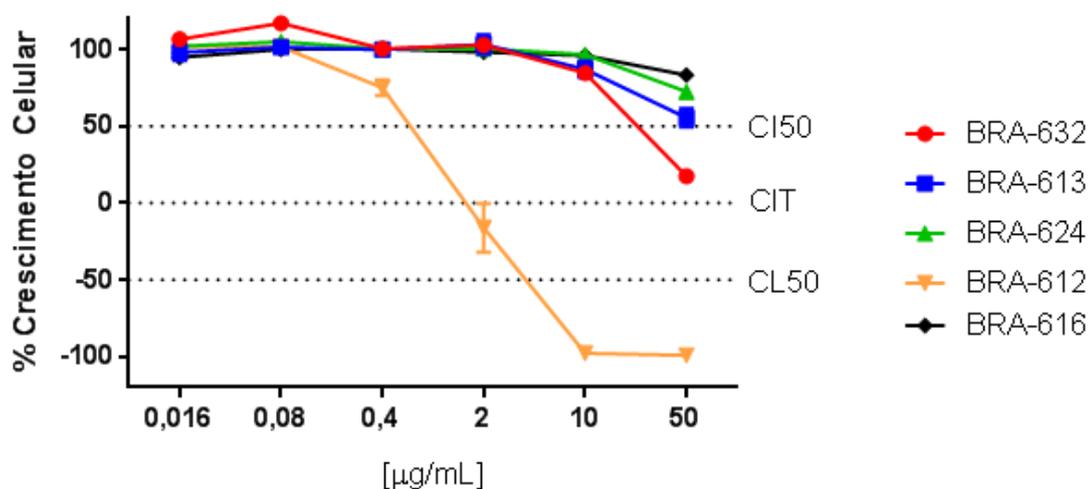


Figura 10: Avaliação da inibição do crescimento celular dos extratos orgânicos por SRB. O ensaio foi realizado em células de câncer de cólon humana (HCT116) em 72 horas. As linhas tracejadas representam, respectivamente, a CI_{50} , a CIT e a CL_{50} . O ensaio foi conduzido com concentração inicial de 50 µg/mL, e a partir dessa concentração foi feita a diluição por fator 5, em triplicata.

A partir do ensaio de curva, e do cálculo das concentrações inibitórias, foi possível perceber que o extrato orgânico da cepa BRA-612 apresentou maior potência, com CI_{50} de 0,244 µg/mL, CIT de 1,287 µg/mL e CL_{50} de 6,792 µg/mL. BRA-632 apresentou CI_{50} de 47,773 µg/mL. Os demais extratos apresentaram CI_{50} acima de 50 µg/mL. Por este motivo, a linhagem BRA-612 teve o extrato escolhido para o fracionamento bioguiado.

5.5 Fracionamento, isolamento e identificação

Resultados preliminares do fracionamento bioguiado utilizando espectrometria de massas indicaram a presença de moléculas pertencentes à classe das prodigininas, cujos principais membros são as prodigiosinas (Figura 11).

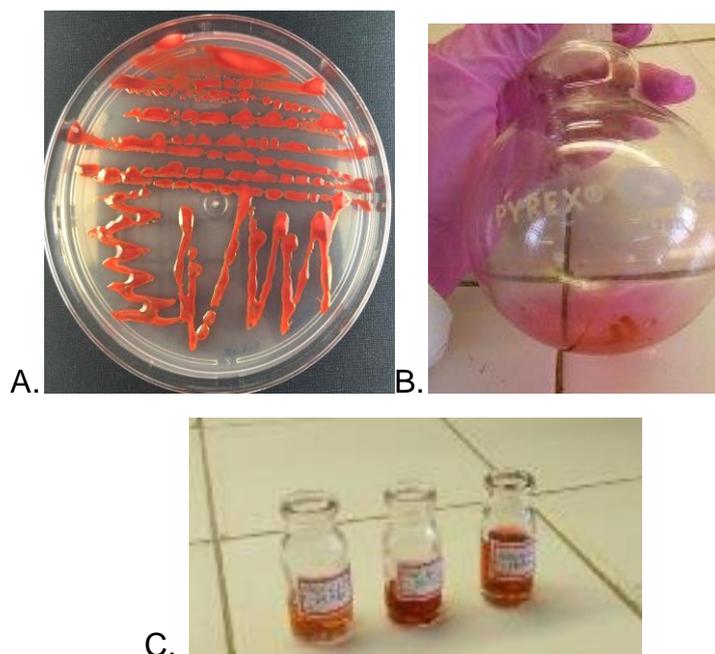


Figura 11: **A.** Imagem da cepa BRA-612 em placa de Petri. **B.** Extrato orgânico de BRA-612 após rotaevaporação. **C.** Extratos orgânicos da cepa BRA-612, 1 - 2 – Extrato obtido em meio líquido, 3 – extrato obtido em meio sólido.

Fonte: Arquivo pessoal da autora.

Das condições testadas, foi observado que o cultivo em meio sólido produziu rendimento de aproximadamente 10 mg, utilizando duas placas de Petri de 150 mm x 20 mm, e teve menor utilização do solvente AcOEt, sendo assim a condição escolhida para o cultivo direcionado para extração.

Com a utilização da cromatografia líquida de alta eficiência foram identificados dois picos principais para isolamento de prodigininas (ANEXO A) do extrato obtido. O principal pico escolhido para isolamento foi correspondente à heptilprodigosina, enquanto o segundo pico escolhido pertence à prodigosina.

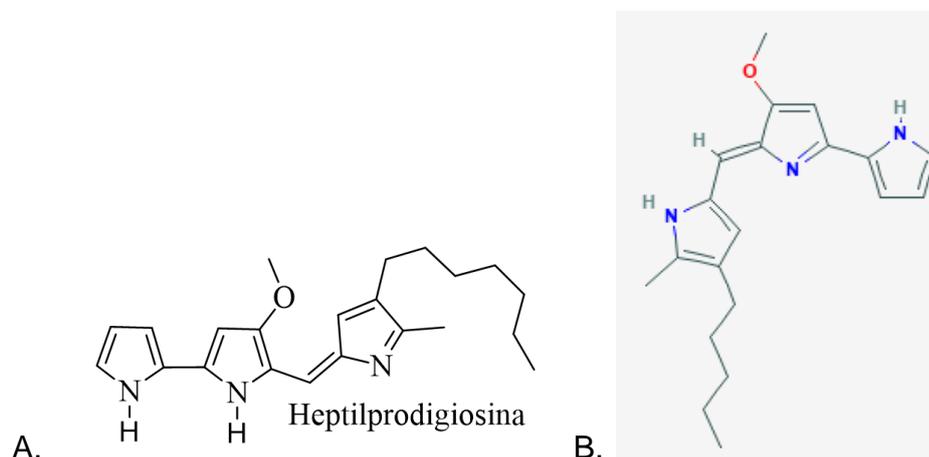


Figura 12: Fórmula estrutural de heptilprodigiosina (A), com fórmula molecular $C_{22}H_{29}N_3O$. Fórmula estrutural de prodigiosina (B), com fórmula molecular $C_{20}H_{25}N_3O$.

Fonte: Arquivo pessoal (A) – elaborada em parceria com LAFIPLAM UFC; PubChem (B), disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/136810559>.

A purificação inicial foi realizada em coluna de sílica, sendo obtidas três frações. A fração contendo os compostos de interesse correspondeu a 8,5 mg, sendo obtida por eluição com Hexano Acetato na proporção de 1:1. Após a verificação de impurezas por espectroscopia de RMN, a amostra foi purificada em coluna com gel SEPHADEX LH20. Após a purificação, foi obtida heptilprodigiosina com pureza de 90% (de acordo com cromatografia de monitoramento em coluna semipreparativa e espectroscopia de RMN – ANEXO A) e rendimento de 9% (51 mg de extrato para 4,2 mg de molécula isolada).

5. 6 Avaliação da atividade citotóxica dos compostos isolados e identificação dos compostos com atividade biológica

A partir do isolamento e identificação de heptilprodigiosina e de prodigiosina, repetiu-se o ensaio de curva (Figura 13, página 50).

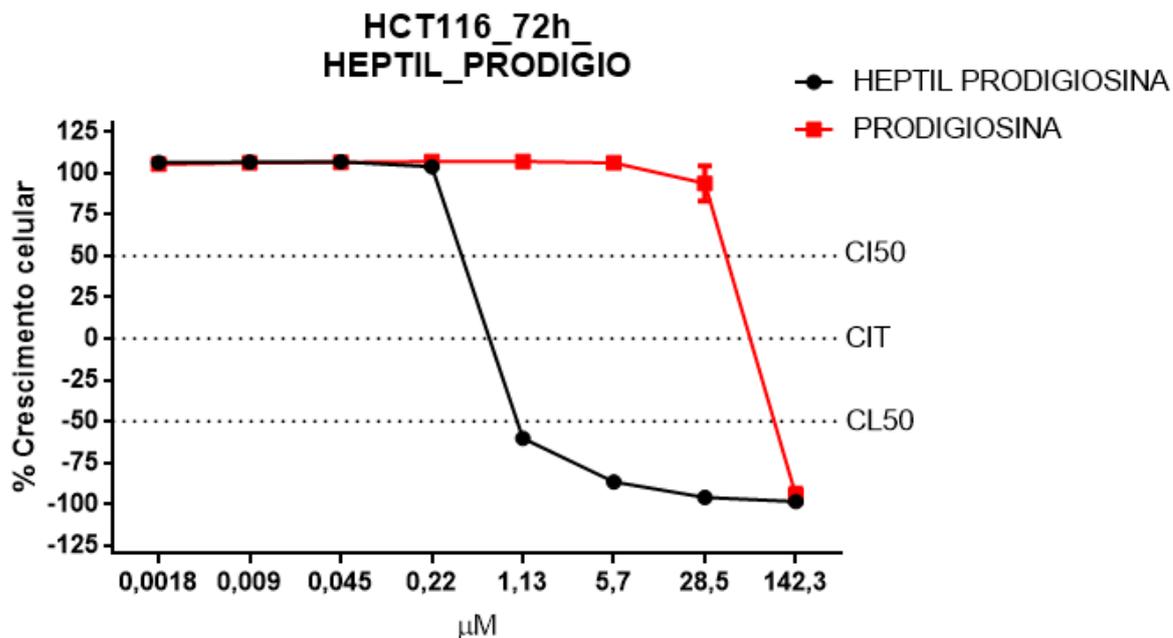


Figura 13: Avaliação da inibição do crescimento celular dos compostos isolados do extrato de BRA-612 em células de câncer de cólon humana (HCT116). As linhas tracejadas representam, respectivamente, a CI_{50} , a CIT e a CL_{50} em incubação de 72 horas. O ensaio foi realizado em triplicata. N=2.

[μM]	heptilprodigosina	prodigosina
CI_{50}	0,094	2,509
CIT	0,783	23,235
CL_{50}	6,522	-

Tabela 2: Informações referentes às concentrações inibitórias médias, concentrações inibitórias totais e concentrações letais médias de heptilprodigosina e prodigosina em células de HCT116.

A partir das concentrações médias calculadas é possível observar que heptilprodigosina teve a maior potência entre as substâncias testadas. Já a prodigosina não identificada também demonstrou atividade nas concentrações utilizadas, ainda que com potência reduzida.

A partir do ensaio inicial com HCT116, foi realizado o SRB para verificar a atividade citotóxica contra células de melanoma murino B16-F10 (Figura 14).

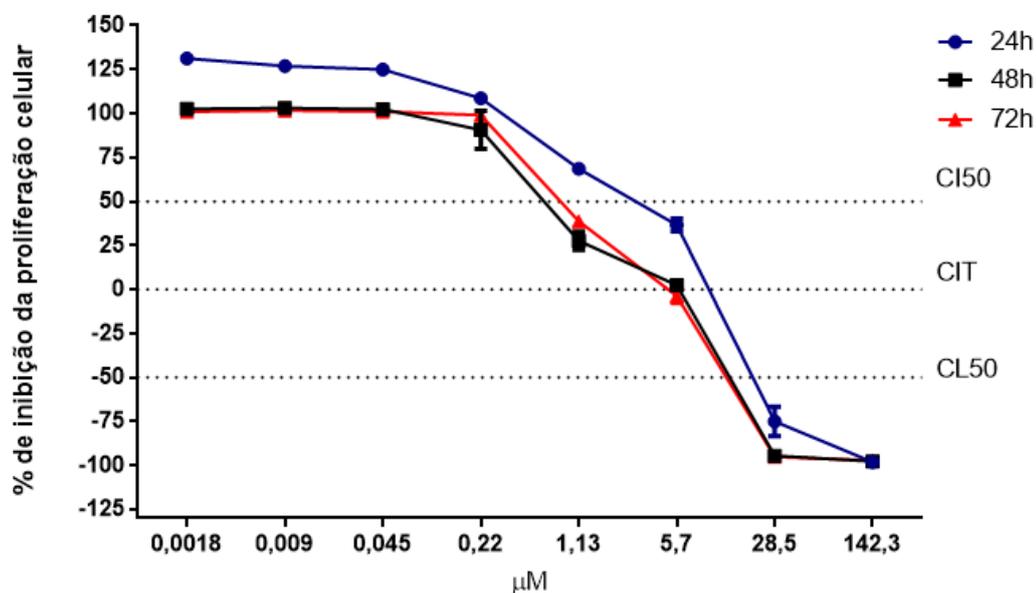


Figura 14: Efeito antiproliferativo de heptilprodigosina contra células da linhagem B16-F10 de melanoma murino metastático, em diferentes períodos de incubação. As linhas tracejadas representam, respectivamente, CI_{50} , CIT e a CL_{50} . O ensaio foi realizado em triplicata.

μM	24 h	48 h	72 h
CI_{50}	0,580	0,185	0,195
CIT	5,882	2,16	2,30
CL_{50}	59,68	25,22	26,83

Tabela 3: Informações referentes às concentrações inibitórias médias, concentrações inibitórias totais e concentrações letais médias de heptilprodigosina para os diferentes períodos de incubação utilizados no ensaio.

A partir dos dados obtidos com a atividade antiproliferativa (Tabela 3), é possível perceber que a resposta máxima contra B16-F10 é obtida já no período de 48 horas. No período de incubação referente a 72 horas não ocorre diferença significativa dos parâmetros de inibição.

5.7 Identificação taxonômica

Após a PCR, a técnica de eletroforese (Figura 15) foi utilizada para avaliar a amplificação dos fragmentos de DNA. A partir da confirmação da amplificação, as amostras foram preparadas para sequenciamento.



Figura 15: Imagem do gel de eletroforese. É possível identificar as bandas de coloração branca indicando a amplificação dos fragmentos. O primeiro poço corresponde ao do marcador utilizado como controle. Bandas circunscritas de vermelho correspondem ao DNA obtido de BRA-612.

Fonte: Arquivo pessoal da autora.

Após purificação, o DNA precipitado foi quantificado utilizando Nanodrop. A concentração obtida foi de 418,2 ng/μL. A amostra de DNA extraída e purificada foi enviada para sequenciamento na Macrogen, Inc. (Coréia do Sul). Dos primers utilizados, somente 518F e 800R emitiram sinal. Após a edição manual, foi obtida sequência consenso de 1.418 pares de base.

>contig obtido do sequenciamento de BRA-612

```
GGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCAGGCCCTAACACATGCAAGTCGAACGGATCCTTCGGGATTAGTGGCAGACGGGTGAG
TAACGCGTGGGAAGCTACCTTGTGGTAGGGAACAACAGTTGGAACGACTGCTAATACCCTATGAGCCCTATGGGGGAAA
GATTTATCGCCATGAGATGTGCCCGCTTAGATTAGCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCGACGATCTATAGCTG
GTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGA
CAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGACGGCCTTAGGGTTGTAAGCTCTTTCAGCAGTGAAGA
TAATGACATTAAGTGCAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTT
GGAATCACTGGGCGTAAAGCGTACGTAGGCGGACTGATCAGTCAGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCCCGGAAGTCC
TTTGATACTGTCTAGTCTTGGATCGAGAGAGGTGAGTGGAACTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAAGAA
CACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGCTCGATACTGACGCTGAGGTACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAC
```

```
CCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCTAGTTGTCAGGTAGCTTGCTATTTGGTGACGCAGCTAACGCATTAAGCAT
TCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT
AATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATTTGGCGCTACAACCGGAGACGGTTGGTTCCCTTCGGGGAC
GTCAGGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCG
CCCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAGGGGGACTGCCGGTGATAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAG
TCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGTGGGCAGCGACCTCGCGAGGGGAAGC
TAATCTCCAAAAGCCGTCTCAGTTCGGATTGTTCTCTGCAACTCGAGAGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGTAACA
GCATGACGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTTTACCCGAAGGCGCT
GTGCTAACCGCAAGGAGGCAGGCGACCACGGTAGGGTCAGCGACTGGGGTGAAGTCGT
```

A sequência consenso foi comparada às sequências disponíveis no BLAST nucleotide. Por análise de query cover, e-value e identidade foram escolhidos os *hits* mais semelhantes. O primeiro *hit* tem como código de acesso JQ515611.1 e é referente a “Uncultured *Pseudovibrio* sp. clone 0307_BHM1_39 16S ribosomal RNA gene, partial sequence”. Também foi obtido *query cover* e identidade de 100% para o acesso NR_029112.1, correspondente a “*Pseudovibrio denitrificans* strain DN34 16S ribosomal RNA, partial sequence”.

6. DISCUSSÃO

No presente trabalho foram recuperadas 10 cepas de microrganismos a partir da ascídia *Euherdmania* sp. e seu sedimento associado, coletados na praia de Taíba-CE. Do total de 10 extratos orgânicos produzidos a partir das cepas obtidas, 50% apresentaram atividade citotóxica em ensaio de triagem realizado em células de câncer colorretal humano (HCT116). Os resultados obtidos demonstram a importância da bioprospecção no litoral nordeste, especialmente diante da necessidade de novas moléculas com atividades farmacológicas. Adicionalmente, a busca de novos compostos ativos contribui ao gerar conhecimento sobre a diversidade química e biológica do ambiente marinho.

Os esforços de isolamento de microrganismos associados à *Euherdmania* sp. desencadeou na obtenção de 10 cepas. Cerca de 99% dos microrganismos ambientais não são passíveis de cultivo em condições laboratoriais (KAEBERLEIN; LEWIS; EPSTEIN, 2002). Dessa forma, as bactérias isoladas em laboratório representam uma pequena fração da diversidade microbiana presente na natureza. Embora ferramentas de metagenômica possam contornar as dificuldades de cultivo e fornecer algumas informações relevantes, o entendimento de fisiologia e do papel ecológico desses microrganismos ainda é dependente de cultivo. Por esse motivo, outras estratégias de cultivo como a co-cultura e a simulação do ambiente microbiano são utilizadas para favorecer a recuperação de microrganismos (STEWART, 2012).

Durante o processamento do material foi utilizado o meio SWA, composto unicamente de ágar e água do mar artificial e, portanto, deficiente em nutrientes essenciais para o desenvolvimento microbiano. Para maximizar a recuperação de cepas bacterianas foi aplicada a estratégia de simulação do ambiente microbiano. Considerando a associação desses microrganismos com a ascídia, foi preparado um extrato nutritivo de *Euherdmania* sp. Em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa (FURTADO, 2016) nenhuma cepa havia sido recuperada com a utilização do meio SWA para microrganismos processados a partir de *Euherdmania* sp. Portanto, a suplementação do meio com o extrato de ascídia estéril deve ter uma composição

nutritiva similar ao ambiente interno do invertebrado, favorecendo o crescimento de microrganismos.

É importante ressaltar que tanto o método de processamento quanto o isolamento dos microrganismos está condicionado ao viés do meio de cultura utilizado e do extrato nutritivo obtido. Dessa forma, diferentes métodos de processamento teriam favorecido diferentes tipos de cepas.

Em um trabalho envolvendo a recuperação de actinomicetos a partir de esponjas, Abdelmohsen *et al.* 2010 utilizou o extrato do invertebrado como estratégia para a recuperação de novas cepas. Dessa forma, a composição do meio de cultura utilizado é crucial para favorecer o cultivo de microrganismos advindos de fontes ambientais, como o ambiente marinho.

Na triagem de avaliação da citotoxicidade por meio de SRB, todos os extratos que apresentaram inibição da proliferação igual ou superior à 75% foram considerados ativos. 5 dos extratos foram considerados como citotóxicos a partir da realização da triagem, o que correspondeu a 50% das amostras testadas. Esse resultado apresenta-se acima da média de cepas com atividade citotóxica depositadas no banco de microrganismos do laboratório, MicroMarin, que é de 15% de extratos ativos (www.labbmar.ufc.br/micromarin).

A potência dos extratos citotóxicos na triagem inicial foi então avaliada. De acordo com metodologia adotada no laboratório, alinhada com valores de referência utilizados pelo NCI (National Cancer Institute) e Journal of Natural Products, extratos com CI_{50} inferior a 5 $\mu\text{g/mL}$ são considerados promissores. O extrato da cepa BRA-612 apresentou maior potência, com CI_{50} de 0,24 $\mu\text{g/mL}$. Os demais extratos apresentaram CI_{50} superior a 5 $\mu\text{g/mL}$. Portanto, o extrato de BRA-612 foi utilizado para fracionamento bioguiado, de forma a identificar, isolar e purificar as amostras responsáveis por sua atividade citotóxica.

O ensaio de SRB foi utilizado para avaliar a inibição da proliferação celular. Trata-se de um ensaio colorimétrico avaliado por espectrofotometria. O método

baseia-se na ligação da sulforodamina a aminoácidos básicos em condições levemente ácidas. Embora o método utilizando tetrazólio, conhecido como MTT, ainda seja predominante, existem diversas vantagens para a utilização do SRB. O MTT é baseado na redução do tetrazólio a formazan. Essa reação é mediada por enzimas mitocondriais como dehidrogenases e redutases, sendo dependente do metabolismo celular. Durante a realização de comparação direta entre os métodos, SRB demonstra maior linearidade, reprodutibilidade e sensibilidade, além de não ser afetado por amostras que alteram o metabolismo celular (KEEPERS *et al.*, 1991).

Adicionalmente, ao se utilizar o SRB com a placa do Tempo Zero é possível distinguir entre o efeito citotóxico e citostático de fármacos. O efeito citotóxico é aquele em que ocorre a morte celular, seja de forma acidental ou programada. Já o efeito citostático se refere à inibição da proliferação celular e crescimento. O efeito citostático ou citotóxico de um composto pode variar pela concentração utilizada, linhagem celular em que a amostra é testada ou tempo de incubação. Dessa forma, o SRB permite visualizar em que concentrações um composto apresenta atividade citotóxica ou citostática (MERVIN *et al.*, 2016).

Resultados preliminares de espectrometria de massas, e posteriormente por ressonância magnética nuclear (RMN) indicaram a presença de moléculas da classe das prodigininas. Para realizar a identificação das moléculas do extrato, e identificar qual das prodigininas seria responsável pela atividade citotóxica, foi realizada a espectrometria de massas, que indicou a presença de heptilprodigiosina e prodigiosina.

Prodigininas são metabólitos secundários bacterianos caracterizados por um anel tripirrólico e coloração vermelha que têm atraído atenção por sua ampla atividade biológica, possuindo atividade antitumoral, imunossupressora, antibiótica e antifúngica (WILLIAMSON *et al.*, 2006). Como o nome sugere, prodigininas foram relacionadas com o acontecimento de diversos milagres prodigiosos, tal como o aparecimento de “sangue” em pão e outros alimentos na idade média (BENNETT; BENTLEY, 2000).

Sua ampla gama de atividades sugere que prodigininas podem ser tóxicas para as espécies produtoras. Em *Streptomyces coelicolor* a expressão de genes relacionados a essas moléculas coincide com um período de cessação do crescimento celular. Em adição, a produção de prodigininas acarreta um evento massivo de morte celular em que a rede multicelular filamentosa de *Streptomyces* passa por mudanças morfológicas relacionadas com o processo de esporulação. Dessa forma, em *Streptomyces coelicolor*, a produção de prodigininas está relacionada com a ocorrência de morte celular programada e o início da esporulação (TENCONI *et al.*, 2018).

A produção de prodigininas é realizada por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, tendo sido descrita em algumas cepas bacterianas tais como bactérias do gênero *Serratia*, *Vibrio* e *Streptomyces* (DARSHAN; MANONMANI, 2015). A autofluorescência de compostos da classe das prodigininas tem sido documentada na literatura. Como os compostos apresentam pigmentação com coloração avermelhada, são utilizadas como moléculas repórter para a elucidação de sua biossíntese (TENCONI *et al.*, 2013).

Por causa de sua coloração, prodigininas foram investigadas como possíveis corantes para a indústria têxtil, de forma a substituírem corantes sintéticos. A obtenção de um corante natural pode reduzir diversos fatores negativos associados à utilização de corantes convencionais, como: dependência de fontes não renováveis de óleo, baixa sustentabilidade operacional, toxicidade ambiental e preocupações relacionadas à saúde humana. O pigmento foi capaz de corar lã, seda, nylon e tecidos acrílicos, demonstrando ainda atividade antibacteriana em *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (ALIHOSSEINI *et al.*, 2008).

Moléculas da classe das prodigininas têm demonstrado eficiente inibição tumoral e indução de apoptose em diferentes linhagens celulares. Embora a ação molecular específica de prodigininas não tenha sido elucidada, é observada a interação com diferentes vias de sinalização por meio da indução de quebras no DNA (PANDEY; CHANDER; SAINIS, 2009). Adicionalmente, tem sido demonstrada a atividade citotóxica de prodigininas em células com resistência a outros

quimioterápicos, como em linhagens de carcinoma pulmonar de pequenas células, GLC4/ADR, que apresentam resistência a múltiplas drogas (LLAGOSTERA *et al.*, 2005). Dessa forma, a compreensão do mecanismo de ação e do alvo específico em que essas moléculas atuam é crucial para avaliar sua possível utilização na clínica (LI *et al.*, 2018).

O efeito de prodigininas na autofagia e indução de morte por estresse de retículo também tem sido avaliado. Em linhagens celulares de câncer de mama foi observado que prodigiosina está envolvida na *up-regulation* marcadores de estresse de retículo, como GRP78 e CHOP, além de ativar fatores importantes na *Unfolded Protein Response*. Dessa forma, prodigiosina induziu a morte celular ao causar estresse de retículo e apoptose (PAN *et al.*, 2012).

Morte celular imunogênica é um tipo de morte celular capaz de eliciar respostas imunes. Esse evento decorre da participação de diversas moléculas conhecidas como padrões associados a danos (DAMPs) e pode ser induzido por fármacos. A ativação do sistema imune resultante da morte celular imunogênica é promissora para o tratamento do câncer, já que células cancerosas adquirem a capacidade de evadir respostas imunológicas (KROEMER *et al.*, 2013). Células sucumbindo à morte celular imunogênica liberam sinais de forma sequencial e de forma espaço-temporal que são decodificados por células do sistema imune. Um desses fatores chaves é a exposição pré-apoptótica de calreticulina, uma proteína do retículo endoplasmático, na membrana celular. Moléculas indutoras de morte imunogênica, como as antraciclinas, mediam intenso estresse de retículo, caracterizado pela geração excessiva de espécies reativas de oxigênio. Portanto, o estresse de retículo e a liberação de calreticulina são etapas essenciais na indução de morte celular imunogênica (KEPP *et al.*, 2013).

A partir dos resultados citados anteriormente, em que prodigiosina foi capaz de eliciar estresse de retículo seguido de apoptose em linhagens celulares de câncer de mama, seria de grande interesse a investigação de moléculas da classe das prodigininas como possíveis indutores de morte imunogênica, aumentando o interesse por esses compostos. Adicionalmente, dados obtidos por Siqueira, 2018, indicaram

por microscopia confocal a possível co-localização de streptorubina (molécula da classe das prodigininas) em organelas ao redor do núcleo, especificamente no retículo endoplasmático.

Heptilprodigosina, um membro da classe das prodigininas, foi identificada no extrato de BRA-612. De fórmula molecular $C_{22}H_{29}N_3O$, uma de suas primeiras descrições foi por Gandhi *et al.* em 1976, com a molécula isolada de *Pseudomonas magnesorubra*, coletada no litoral da Índia. Algumas atividades descritas se referem a sua capacidade antimalarial, antiparasitária e antimicrobiana. Já em 2007 foi isolada heptil prodigosina da bactéria *Pseudovibrio denitrificans* associada a um tunicado (LAZARO *et al.*, 2002; SERTAN-DE GUZMAN *et al.*, 2007).

O extrato de BRA-612 a partir do qual heptilprodigosina foi identificada, teve perfil de CLAE demonstrando a presença de heptilprodigosina e outra prodiginina. A predominância e coloração desses compostos permitiu o isolamento facilitado, sendo possível utilizar somente a coluna de SEPHADEX para a purificação dos compostos. Dessa forma, o isolamento e purificação de heptilprodigosina se torna menos custoso devido à sua coloração.

Adicionalmente, para a produção dos extratos foram utilizadas duas placas de Petri de 150 mm x 20 mm (volume de 30 mL) comparativamente com cultivo líquido de 100 mL. Ambos forneceram rendimento similar (cerca de 10 mg de extrato bruto), embora a utilização do meio de cultura sólida tenha usado aproximadamente metade do volume de AcOEt comparado ao cultivo líquido. Dessa forma, outra estratégia para baratear a produção seria o cultivo sólido, já que há uso reduzido de solvente e não há a necessidade de agitação mecânica da cultura.

Embora heptilprodigosina tenha sido descrita na literatura (LAZARO *et al.*, 2002), sua atividade anticâncer não foi ainda relatada, em detrimento de outras moléculas da classe das prodigininas, como a prodigosina. Apesar disso, sua atividade antimalarial (LAZARO *et al.*, 2002) e de sinergismo com outros fármacos, como Adociaquinona B contra linhagens MCF-7 de câncer de mama (BOJO *et al.*, 2010) têm sido descritas, evidenciando seu potencial biológico.

Para avaliar a inibição da proliferação dos compostos isolados do extrato orgânico de BRA-612 foi realizado o SRB em células de câncer colorretal humano (HCT116). A partir da realização do ensaio em concentrações seriadas foi possível calcular parâmetros inibitórios que permitem a comparação entre as duas moléculas. A CI_{50} para a heptilprodigiosina foi de 0,094 μM , enquanto a CI_{50} para a possível prodigiosina foi de 2,509 μM . A atividade de prodigiosina já é bem descrita na literatura. Em linhagens humanas de câncer colorretal (HCT-8), prodigiosina apresentou CI_{50} de 0,05 $\mu\text{g/mL}$, atividade mais potente do que a obtida no presente trabalho (ARTHAUD *et al.*, 2012). O baixo rendimento na produção de prodigiosina por BRA-612 ou a quantidade de impurezas presentes mesmo após o isolamento podem ser fatores relacionados com a potência aquém do esperado.

Após o isolamento e purificação de heptilprodigiosina foi possível obter a molécula com 90% de pureza e com rendimento de 9%. A obtenção de tão alta pureza utilizando duas técnicas de cromatografia é um fator crucial para a viabilidade do processo em escalas maiores (NEWMAN, 2016). O rendimento também é um fator extremamente importante na produção de moléculas naturais, sendo 9% um rendimento considerado alto (MÜLLER *et al.*, 2000). Adicionalmente, a otimização da utilização de AcOEt conseguida com a utilização da extração em meio sólido também favorece a produção de heptilprodigiosina de forma mais

A linhagem celular de câncer colorretal humano HCT116 é utilizada tanto durante a realização de triagem como de ensaios de viabilidade celular, já que não se caracteriza como uma linhagem resistente, mas também não é extremamente suscetível a tratamentos. Dessa forma, por sua característica de interação intermediária com quimioterápicos, se trata de uma linhagem adequada para ensaios iniciais de prospecção.

De forma posterior aos ensaios de SRB com HCT116, foram realizados os mesmos ensaios com a linhagem de melanoma murino metastático, B16-F10, obtendo CI_{50} de 0,195 μM . Essa linhagem celular já se caracteriza por possuir maior resistência em relação a HCT116. Por esse motivo, se torna mais interessante para estudos mais

aprofundados. Adicionalmente, trata-se de uma célula com morfologia ideal para visualização em microscópio.

Com o sequenciamento da região 16S é possível identificar a similaridade entre sequências de DNA. O sequenciamento do DNA extraído de BRA-612 apresentou boas leituras para os primers 518F e 800R, e após edição manual foi formada sequência consenso de 1.418 pares de base. Ao comparar o contig formado com as sequências depositadas no BLAST, foi possível identificar que BRA-612 pertence ao gênero *Pseudovibrio* sp.. Também foi possível perceber alto grau de similaridade (100%) a fragmentos de RNA ribossomal de *Pseudovibrio denitrificans*. Dessa forma, podemos sugerir que BRA-612 pertence ao gênero *Pseudovibrio* sp. e é filogeneticamente próxima a *P. denitrificans*.

Esses dados são coerentes com relatos presentes na literatura de bactérias do gênero *Pseudovibrio* sendo associadas ao ambiente marinho e a hospedeiros eucarióticos como tunicados, esponjas e corais (ALEX; ANTUNES, 2018). O gênero tem sido relacionado com a produção de metabólitos secundários, e se caracteriza por sua ampla distribuição. São alfa-proteobactérias com metabolismos versáteis e capazes de sobreviver em condições extremas, como: altas concentrações de metais pesados e metabolizar compostos tóxicos (ROMANO, 2018). Foram encontrados membros do gênero tanto associados a invertebrados marinhos quanto isolados, mas pouco se sabe sobre a sua fisiologia e sobre as interações estabelecidas com seus hospedeiros (BONDAREV *et al.*, 2013).

A primeira publicação de *P. denitrificans* data de 2004, tendo sido isolada de água do mar coletada em Nanwan Bay, em Taiwan. Se caracteriza como uma espécie heterotrófica, anaeróbia facultativa e marinha de bactérias Gram-negativas. A denominação *denitrificans* se refere a sua capacidade de realizar o processo de desnitrificação, que consiste da redução de nitrato (NO_3^-) ou nitrito (NO_2^-) aos produtos gasosos óxido nitroso (N_2O) ou gás nitrogênio (N_2). Diversas bactérias realizam esse processo ao oxidar nitrato ou nitrito como aceptores finais de elétrons. Também foi demonstrado que a espécie realiza processos fermentativos (SHIEH; LIN; JEAN, 2004).

Isolados microbianos produtores de heptilprodigiosina coletados de um tunicado nas Filipinas, foram identificados como uma cepa de *P. denitrificans* (SERTAN-DE GUZMAN *et al.*, 2007). Dessa forma, a similaridade de BRA-612 com *P. denitrificans* é coerente com os resultados demonstrados no presente trabalho. Essa espécie bacteriana também foi isolada de esponjas *Arenosclera brasiliensis* coletadas na praia de João Fernandinho em Búzios, Rio de Janeiro. A extração da cultura líquida utilizando metanol e acetona permitiu a recuperação de alcaloides derivados de bromotirosina, previamente só recuperados de esponjas marinhas (NICACIO *et al.*, 2017). Essa classe de compostos apresenta atividades biológicas como atividade citotóxica moderada (CI₅₀ de 0,7 µM) em células de carcinoma epitelial humano (KB) e inibição da acetilcolinesterase (EL-DEMERDASH *et al.*, 2018).

No desenvolvimento de fármacos há um gargalo entre a descoberta e a realização de estudos clínicos em humanos, denominado de Vale da Morte (*Valley of Death*). Entre os problemas que podem acarretar na falha de um composto promissor estão a solubilidade, estabilidade, parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos e a toxicidade. Entretanto, um dos principais gargalos associados a compostos advindos de produtos naturais é a demanda, já que estratégias como a síntese química normalmente não são possíveis devido à complexidade estrutural de alguns compostos naturais (NEWMAN, 2016). No caso de Ecteinascidina 743, um composto anticâncer derivado de ascídia e comercializado com o nome Yondelis[®], foi necessário estabelecer uma estratégia de cultivo para os animais. Ainda assim, a produtividade alcançada era baixa para o número de animais utilizados, sendo assim desenvolvida uma estratégia semissintética (CUEVAS; FRANCESCH, 2009).

Microrganismos se caracterizam como fontes mais interessantes para a produção de compostos com atividade biológica quando comparados à utilização de animais, já que a necessidade de extrativismo é amenizada. O cultivo de microrganismos também é facilitado e menos custoso quando comparado ao cultivo de animais. Dessa forma, a descoberta de substâncias bioativas em microrganismos permite o desenvolvimento mais sustentável caso o composto seja comercializado (ROMANO *et al.*, 2017).

O diferente perfil de metabólitos observado em *Pseudovibrio* sp. BRA-612 e *P. denitrificans* isolada de *A. brasiliensis* pode decorrer das diferentes relações de simbiose formadas pelos microrganismos ou do meio de cultura utilizado. Adicionalmente, a distribuição de *P. denitrificans* por diferentes hospedeiros e em diferentes localidades sugere a ubiquidade e importância ecológica da espécie.

Em Furtado, 2016, a cepa BRA-342 também demonstrou ser do gênero *Pseudovibrio* tendo sido coletada de *Euherdmania* sp. de Taíba-CE. O microrganismo isolado apresentou prodigiosina no seu extrato, mas não foi relatada a presença de heptilprodigiosina. BRA-342 também apresentou alta similaridade com *P. denitrificans*. Tal achado pode sugerir uma associação bem estabelecida entre *Pseudovibrio* e *Euherdmania* sp, e a importância das prodigininas como metabólito secundário para defesa das ascídias.

Dessa forma, as prodigininas encontradas neste trabalho possuem um grande potencial farmacológico para a terapia anticâncer, sendo ressaltada a atividade *in vitro* demonstrada por heptilprodigiosina. Durante o isolamento e purificação de heptilprodigiosina, foi percebido o favorecimento do cultivo em meio sólido, tanto pela menor utilização do solvente AcOEt, quanto pela ausência de aeração requerida no processo. A coloração característica da molécula favoreceu seu isolamento por cromatografia em coluna de sílica e SEPHADEX.

A heptilprodigiosina descrita nesse trabalho pode ser utilizada como ferramenta farmacológica pela indústria, especialmente no que tange sua utilização como controle de experimentos. Para prosseguir no estudo da sua potencial utilização como quimioterápico, é necessário estabelecer um mecanismo de ação da molécula, bem como determinar o tipo de morte celular que ocorre.

7. CONCLUSÕES

As bactérias associadas à *Euherdmania* sp. coletadas na costa cearense produzem compostos citotóxicos, se caracterizando como fontes promissoras de fármacos anticâncer. Foi possível obter heptilprodigiosina, com alta pureza e rendimento, e prodigiosina, moléculas da classe das prodigininas, com relatada atividade anticâncer. Heptilprodigiosina demonstrou potência em linhagens celulares *in vitro* HCT 116e B16-F10. A cepa produtora de heptilprodigiosina foi identificada como *Pseudovibro* sp. BRA-612. Dessa forma, microrganismos associados à ascídia *Euherdmania* sp. apresentam potencial biotecnológico no que tange a produção de substâncias com atividade anticâncer.

6. REFERÊNCIAS:

ABDELMOHSEN, U. R. *et al.* Isolation, phylogenetic analysis and anti-infective activity screening of marine sponge-associated actinomycetes. **Marine drugs**, v. 8, n. 3, p. 399–412, 26 fev. 2010.

ALEX, A.; ANTUNES, A. Genus-wide comparison of *Pseudovibrio* bacterial genomes reveal diverse adaptations to different marine invertebrate hosts. **PloS one** v. 13, n. 5, 2018.

ALIHOSSEINI, F. *et al.* Antibacterial colorants: characterization of prodiginines and their applications on textile materials. **Biotechnology Progress**, v. 24, n. 3, p. 742–747, 6 jun. 2008.

ARTHAUD, I. D. B. *et al.* Studies on the secondary metabolites of a *Pseudoalteromonas sp.* isolated from sediments collected at the northeastern Coast of Brazil. **Chemistry & Biodiversity**, v. 9, n. 2, p. 418–427, fev. 2012.

AZIM, J. A. *et al.* Long-term toxic effects of adjuvant chemotherapy in breast cancer. **Annals of Oncology**, v.22, n.9, p.1939–1947, set. 2011.

BAUERMEISTER, A. *et al.* Tunicates: A model organism to investigate the effects of associated-microbiota on the production of pharmaceuticals. **Drug Discovery Today: Disease Models**, 12 set. 2019.

BISHAYEE, A.; SETHI, G. Bioactive natural products in cancer prevention and therapy: Progress and promise. **Seminars in Cancer Biology**, v. 40-41, p. 1–3, 1 out. 2016.

BONDAREV, V. *et al.* The genus *Pseudovibrio* contains metabolically versatile bacteria adapted for symbiosis. **Environmental microbiology** v. 15, n. 7, p. 2095–113, jul. 2013.

BLUNT, J. W. *et al.* Marine natural products. **Natural Products Reports**, v. 28, n. 2, p. 196–268, 25 jan. 2011.

CALCATERRA, A.; D'ACQUARICA, I. The market of chiral drugs: chiral switches versus *de novo* enantiomerically pure compounds. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. Elsevier B.V., v.147, p.323-340, 5 jan. 2018.

CARROLL, Anthony R. *et al.* Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 36, n. 1, p. 122–173, 25 jan. 2019.

CHEN, L. *et al.* Biological and Chemical Diversity of Ascidian-Associated Microorganisms. **Marine Drugs**, v. 16, n. 10, 2018.

COOPER, GM. **The Cell: A Molecular Approach**. Massachusetts: Sunderland, 2000.

COSTA-LOTUFO, L. V. *et al.* Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: histórico & perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 703–716, 2009.

CUEVAS, C.; FRANCESCH, A.. Development of Yondelis® (trabectedin, ET-743). A semisynthetic process solves the supply problem. **Natural Product Reports** v. 26, n. 3, p. 322, 25 fev. 2009.

DARSHAN, N.; MANONMANI, H. K. Prodigiosin and its potential applications. **Journal of food science and technology**, v. 52, n. 9, p. 5393–407, set. 2015.

DRAKE, C. G.; LIPSON, E. J.; BRAHMER, J. R. Breathing new life into immunotherapy: Review of melanoma, lung and kidney cancer. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v.11,n.1, p.24-37, jan. 2014.

EL-DEMERDASH, A. *et al.* Bioactive bromotyrosine-derived alkaloids from the polynesian sponge suberea ianthelliformis. **Marine Drugs**, v. 16, n. 5, 1 maio 2018.

EVANS, J. S. *et al.* Introduced ascidians harbor highly diverse and host-specific symbiotic microbial assemblages. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 1 dez. 2017.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva - Rio de Janeiro: INCA, 2018. 122p.: il. color.

FENICAL, W. New pharmaceuticals from marine organisms. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 9, p. 339–341, set. 1997.

FOUAD, Y. A.; AANEI, C. Revisiting the hallmarks of cancer. **American journal of cancer research**, v. 7, n. 5, p. 1016–1036, 2017.

FRANKEN, N. A. P. *et al.* Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315–2319, dez. 2006.

FURTADO, L.C. Prospecção de compostos com potencial anticâncer obtidos de bactérias recuperadas de ascídias da praia da Taíba-CE. **Trabalho de conclusão de curso (graduação)** - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2017.

FURTADO, L.C. Potencial anticâncer de substâncias isoladas de *Streptomyces sp.* recuperada da ascídia *Euherdmania sp.* **Dissertação (Mestrado)** - Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Médicas. São Paulo, 2019.

GANDHI, N. M. *et al.* Prodigiosin metabolites of a marine *Pseudomonas* species. **Marine Biology**, v. 34, n. 3, p. 223–227, fev. 1976.

GOODBODY, Ivan. The Physiology of Ascidians. **Advances in Marine Biology** v. 12, p. 1–149, 1 jan. 1975.

GUO, J. *et al.* Synthesis and cytotoxicity screening of derivatives of the simplified ecteinascidin pentacyclic skeleton as anticancer agents. **Tetrahedron Letters**, v. 59, n. 33, p. 3202–3205, 15 ago. 2018.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 7 jan. 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, mar. 2011.

HAEFNER, B. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. **Drug Discovery Today**, 15 jun. 2003.

HEUER, H. *et al.* 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, 1997.

JACKSON, J. B. C.; BUSS, L. Allelopathy and spatial competition among coral reef invertebrates. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, National Academy of Sciences, 5 aug.1975. Disponível em: <<https://www.jstor.org/stable/65368>>. Acesso em: 27 ago. 2019.

JIMENEZ, P.; WILKE, D.; COSTA-LOTUFO, L. Marine drugs for cancer: surfacing biotechnological innovations from the oceans. **Clinics**, v. 73, n. Suppl 1, 9 out. 2018.

JIMENEZ, P. C. *et al.* Cytotoxic activity of a dichloromethane extract and fractions obtained from *Eudistoma vancouveri* (Tunicata: Ascidiacea). **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 151, n. 3, p. 391–398, nov. 2008.

JIMENEZ, P. C. *et al.* Structure elucidation and anticancer activity of 7-oxostaurosporine derivatives from the Brazilian endemic tunicate *Eudistoma vancouveri*. **Marine Drugs**, v. 10, n. 5, p. 1092–1102, maio 2012.

JIMENEZ, P. C. *et al.* Enriching Cancer Pharmacology with Drugs of Marine Origin. **British Journal of Pharmacology**, 17 out. 2019.

KAEBERLEIN, T.; LEWIS, K.; EPSTEIN, S. S. Isolating “uncultivable” microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. **Science**, v. 296, n. 5570, p. 1127–1129, 10 maio 2002.

KEPP, Oliver *et al.* Crosstalk between ER stress and immunogenic cell death. **Cytokine & Growth Factor Reviews** v. 24, n. 4, p. 311–318 , 1 ago. 2013.

KEEPERS, Yvonne P. *et al.* Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing. **European Journal of Cancer and Clinical Oncology** v. 27, n. 7, p. 897–900, 1991.

KROEMER, Guido *et al.* Immunogenic cell death in cancer therapy., **Annual Review of Immunology**, v. 31, p. 51-72, 2013.

KUMAR, M. S.; ADKI, K. M. Marine natural products for multi-targeted cancer treatment: A future insight. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 105, p. 233–245, 1 set. 2018.

LAMBERT, C. C.; LAMBERT, G. Persistence and differential distribution of nonindigenous ascidians in harbors of the Southern California Bight. **Marine Ecology Progress Series**, v. 259, p. 145–161, 12 set. 2003.

LAZARO, J. E. H. *et al.* Heptyl prodigiosin, a bacterial metabolite, is antimalarial in vivo and non-mutagenic in vitro. **Journal of natural toxins**, v. 11, n. 4, p. 367–77, dez. 2002.

LI, D. *et al.* Biological Potential and Mechanism of Prodigiosin from *Serratia marcescens* Subsp. *lawsoniana* in human choriocarcinoma and prostate cancer cell lines. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 11, p. 3465, 4 nov. 2018.

LLAGOSTERA, E. *et al.* High cytotoxic sensitivity of the human small cell lung doxorubicin-resistant carcinoma (GLC4/ADR) cell line to prodigiosin through apoptosis activation. **Anti-cancer drugs**, v. 16, n. 4, p. 393–9, 1 abr. 2005.

LÓPEZ-LEGENTIL, S.; TURON, X.; SCHUPP, P. Chemical and physical defenses against predators in Cystodytes (Ascidiacea). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 332, n. 1, p. 27–36, 2 maio 2006.

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

MARGULIS, Lynn; FESTER, René. **Symbiosis as a source of evolutionary innovation : speciation and morphogenesis**. MIT Press, 1991. 454 p. Disponível em: <[https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=3sKzeiHUIUQC&oi=fnd&pg=PR9&dq=Margulis+L.+Symbiosis+as+a+source+of+evolutionary+innovation:+speciation+and+morphogenesis.&ots=uJCOPyUWRg&sig=DrhJz89u0PMxZJB7NM6mpEwBwN0#v=onepage&q=Margulis L. Symbiosis as a source of evolutionary innovation%3A speciation and morphogenesis.&f=false](https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=3sKzeiHUIUQC&oi=fnd&pg=PR9&dq=Margulis+L.+Symbiosis+as+a+source+of+evolutionary+innovation:+speciation+and+morphogenesis.&ots=uJCOPyUWRg&sig=DrhJz89u0PMxZJB7NM6mpEwBwN0#v=onepage&q=Margulis+L.+Symbiosis+as+a+source+of+evolutionary+innovation%3A+speciation+and+morphogenesis.&f=false)>. Acesso em: 3 nov. 2019.

MARK HAY, B. E.; FENICAL, W. Chemical ecology and marine biodiversity: insights and products from the sea, **Oceanography**, v. 09, n. 1, p. 10-20, 1996.

MAYO CLINIC. 5 abril 2019. Disponível em: <<https://www.mayoclinic.org/tests-procedures/cancer-treatment/about/pac-20393344>> Acesso em 17/09/2019.

MEIRELLES, P. M. *et al.* BaMBa: Towards the integrated management of Brazilian marine environmental data. **Database**, v. 2015, n. 1, 2015.

METAXAS, Y. *et al.* 1817TiPSAKK 17/16 - Lurbinectedin monotherapy in patients with progressive malignant pleural mesothelioma: a multicenter, single-arm phase II trial. **Annals of Oncology**, v. 29, n. suppl.8, 1 out. 2018.

MERVIN, Lewis H. *et al.* Understanding cytotoxicity and cytostaticity in a high-throughput screening collection. **ACS Chemical Biology** v. 11, n. 11, p. 3007–3023, 18 nov. 2016.

MOLINSKI, T. F. *et al.* Drug development from marine natural products. **Nature Reviews Drug Discovery**, 2009.

MÜLLER, H. *et al.* Natural products in drug discovery. **Ernst Schering Research Foundation workshop**, 2000

NEWMAN, David J. Developing natural product drugs: supply problems and how they have been overcome. **Pharmacology & Therapeutics** v. 162, p. 1–9, 1 jun. 2016.

NICACIO, K. J. *et al.* Cultures of the marine bacterium *Pseudovibrio denitrificans* Ab134 produce bromotyrosine-derived alkaloids previously only isolated from marine sponges. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 2, p. 235–240, 24 fev. 2017.

PAN, Mu Yun *et al.* Prodigiosin activates endoplasmic reticulum stress cell death pathway in human breast carcinoma cell lines. **Toxicology and Applied**

Pharmacology v. 265, n. 3, p. 325–334 , 15 dez. 2012.

PANDEY, R.; CHANDER, R.; SAINIS, K. Prodigiosins as anticancer agents: living up to their name. **Current Pharmaceutical Design**, v. 15, n. 7, p. 732–741, 1 mar. 2009.

PATRIDGE, E. *et al.* An analysis of FDA-approved drugs: Natural products and their derivatives. **Drug Discovery Today**, v. 21, n.2, p.204-207, 2016.

PEREIRA, R. B. *et al.* Marine-Derived Anticancer Agents: Clinical Benefits, Innovative Mechanisms, and New Targets. **Marine Drugs** v. 17, n. 6, p. 329, 2 jun. 2019.

PITOT, H. C. The molecular biology of carcinogenesis. **Cancer**, v. 72, n. 3 S, p. 962–970, 1993.

PUCK, T. T.; MARCUS, P. I. Action of x-rays on mammalian cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 103, n. 5, p. 653–666, 1 maio 1956.

PUYO, S.; MONTAUDON, D.; POURQUIER, P. From old alkylating agents to new minor groove binders. **Critical Reviews in Oncology/Hematology** v. 89, n. 1, p. 43–61, 1 jan. 2014.

QUASTHOFF, S.; HARTUNG, H. P. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **Journal of Neurology**, v. 249, n. 1, p. 9–17, jan. 2002.

RINEHART, K. L. *et al.* Ecteinascidins 729, 743, 745, 759A, 759B, and 770: potent antitumor agents from the Caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata*. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 55, n. 15, p. 4512–4515, jul. 1990.

RINEHART, K. L. Secondary metabolites from marine organisms. **Ciba Foundation symposium**, v. 171, p. 236–49; discussion 249-54, 1992.

ROMANO, G. *et al.* Marine microorganisms as a promising and sustainable source of bioactive molecules. **Marine Environmental Research** v. 128, p. 58–69 , 1 jul. 2017.

ROMANO, S. Ecology and biotechnological potential of bacteria belonging to the genus *Pseudovibrio* applied and environmental microbiology. **American Society for Microbiology**, v.84 , n.8, 1 abr. 2018.

SAFARI, M.; KHOSHNEVISAN, A. Cancer stem cells and chemoresistance in glioblastoma multiform: A review article. **Stem Cells: Mediated Regeneration**. Nova Science Publishers, Inc., 2016. p. 243–262.

SARKAR, S. *et al.* Cancer development, progression, and therapy: an epigenetic overview. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 10, p. 21087–113, 21 out. 2013.

SCHMIDT, E. W. *et al.* Patellamide A and C biosynthesis by a microcin-like pathway in *Prochloron didemni*, the cyanobacterial symbiont of *Lissoclinum patella*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 20, p. 7315–7320, 17 maio 2005.

SCHMIDT, E. W. The secret to a successful relationship: lasting chemistry between ascidians and their symbiotic bacteria. **Invertebrate biology : a quarterly journal of the American Microscopical Society and the Division of Invertebrate Zoology/ASZ**, v. 134, n. 1, p. 88–102, 1 mar. 2015.

SERTAN-DE GUZMAN, A. A. *et al.* *Pseudovibrio denitrificans* strain Z143-1, a heptyl prodigiosin-producing bacterium isolated from a Philippine tunicate. **FEMS Microbiology Letters**, v. 277, n. 2, p. 188–196, 1 dez. 2007.

SHIEH, W. Y.; LIN, Y.; JEAN, W. D. *Pseudovibrio denitrificans* gen. nov., sp. nov., a marine, facultatively anaerobic, fermentative bacterium capable of denitrification. **INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY** v. 54, n. 6, p. 2307–2312 , 1 nov. 2004.

SIMON, Jean-Christophe *et al.* Host-microbiota interactions: from holobiont theory to analysis. **Microbiome** v. 7, n. 1, p. 5 , 11 dez. 2019.

SIMMONS, T. L. *et al.* Marine natural products as anticancer drugs. **Molecular cancer therapeutics**, v. 4, n. 2, p. 333–42, 1 fev. 2005.

SIQUEIRA, E. A. Potencial anticâncer de prodigiosinas isoladas de micro-organismos associados a *Zoanthus sociatus* das ilhas oceânicas do Brasil. **Dissertação (Mestrado)** – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

SKEHAN, P. *et al.* New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107–1112, 4 jul. 1990.

STEWART, E. J. Growing unculturable bacteria. **Journal of Bacteriology**, v.196, n. 16, p. 4151-4160 ago. 2012.

TENCONI, E. *et al.* Use of red autofluorescence for monitoring prodiginine biosynthesis. **Journal of Microbiological Methods**, v. 93, n. 2, p. 138–143, 2013.

THOMPSON, F. *et al.* Marine biotechnology in Brazil: Recent developments and its potential for innovation. **Frontiers in Marine Science**, v. 5, n. JUL, 9 jul. 2018.

VICHAJ, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1112–1116, ago. 2006.

WATTERS, D. J. Ascidian toxins with potential for drug development. **Marine drugs**, v. 16, n. 5, 2018.

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, 1 jan. 2009.

WILLIAMSON, N. R. *et al.* The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 12, p. 887–899, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Cancer. Cancer country profiles. 2018. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em: 20/06/2019.

ZENAIDA P. BOJO, C. D. D. *et al.* Synergistic in vitro cytotoxicity of adociaquinone B and heptyl prodigiosin against MCF-7 breast cancer cell line. **Philippine Science Letters**, v. 3, n. No.2, p. 48–58, 2010.