



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR – LABOMAR**

**ELTHON GOIS FERREIRA**

**DIVERSIDADE E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ACTINOMICETOS  
RECUPERADOS DO SEDIMENTO MARINHO COLETADO NO ARQUIPELÁGO  
SÃO PEDRO E SÃO PAULO, BRASIL.**

**FORTALEZA**

**2014**

**ELTHON GOIS FERREIRA**

**DIVERSIDADE E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ACTINOMICETOS  
RECUPERADOS DO SEDIMENTO MARINHO COLETADO NO ARQUIPELÁGO  
SÃO PEDRO E SÃO PAULO, BRASIL.**

Tese submetida à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais do Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Ciências Marinhas Tropicais.

Área de concentração: Utilização e Manejo de Ecossistemas Marinhos e Estuarinos

Orientadora: Profa. Dra. Letícia Veras Costa Lotufo

Co-orientadora: Profa. Dra. Paula Christine Jimenez

**FORTALEZA**

**2014**

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)

---

- F44d Ferreira, Elthon Gois.  
Diversidade e potencial biotecnológico de actinomicetos recuperados do sedimento marinho coletado no arquipélago São Pedro e São Paulo, Brasil. / Elthon Gois Ferreira. – 2014.  
158 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar, Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, Fortaleza, 2014.  
Orientação: Profa. Dra. Letícia Veras Costa-Lotufo.  
Coorientação: Profa. Dra. Paula Christine Jimenez.
1. Microrganismos Marinhos. 2. Prospecção Biotecnológica. 3. Atividade Citotóxica. 4. Diversidade Microbiana. I. Título.

---

CDD 551.46

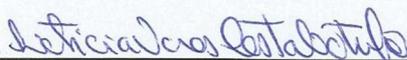
## ELTHON GOIS FERREIRA

### “DIVERSIDADE E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ACTINOMICETOS RECUPERADOS DO SEDIMENTO MARINHO COLETADO NO ARQUIPÉLAGO SÃO PEDRO E SÃO PAULO, BRASIL.”

TESE submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, do Instituto de Ciências do Mar, da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de DOUTOR em Ciências Marinhas Tropicais, área de concentração em Utilização e Manejo de Ecossistemas Marinhos e Estuarinos.

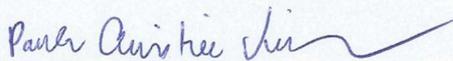
Aprovada em, 15 de dezembro de 2014.

#### BANCA EXAMINADORA



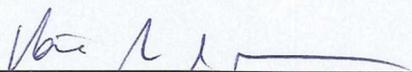
---

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



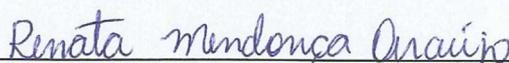
---

Profa. Dra. Paula Christine Jimenez (Co-Orientadora)  
Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP



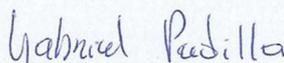
---

Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo (Membro Interno)  
Universidade Federal do Ceará – UFC



---

Profa. Dra. Renata Mendonça Araújo (Membro Externo)  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN



---

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

A minha avó por ter disponibilizado toda sua vida para me conceder uma boa educação, por ser responsável pela formação do meu caráter e por todo cuidado e zelo, além do seu exemplo de perseverança.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a **Deus** pelo dom da vida, pelos meus familiares e amigos a mim proporcionados e agradecer pela sempre estar me guiando pelos caminhos que tenho traçado durante essa vida.

A **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Letícia Veras Costa-Lotufo**, minha orientadora e amiga, primeiramente por aceitar me orientar durante esses anos no laboratório, contribuir para o meu crescimento profissional, por acreditar em mim, me mostrar o caminho da ciência, da ética, pela sua paciência, seu otimismo, por fazer parte da minha vida nos momentos bons e ruins, por ser exemplo de pessoa e profissional e por todos os aconselhamentos dados, nunca me deixando baixar a cabeça e sempre me mostrando o caminho a ser seguido.

A **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Paula Christine Jimenez**, minha co-orientadora e amiga, por existir durante toda essa minha fase de aprendizado e crescimento profissional, não teria chegado até aqui sem todo seu empenho em me ajudar, me ensinar e me permitir entrar na pesquisa de produtos naturais marinhos ao selado, por todos esses anos de sincera amizade, por todos os ensinamentos sobre a vida, pelos momentos de conversas onde sempre tirei algum aprendizado e pelo enorme prazer em poder ter dividido alguns salões e rodas de samba as quais eu sempre vou levar na memória.

A **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Otilia Deusdênia Loiola Pessoa** por acreditar nos produtos naturais marinhos e ter permitido que parte deste trabalho tenha sido realizada dentro de seu laboratório, por todo seu carisma, alegria e empenho.

A **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vânia Maria Maciel Melo** por permitir a realização de parte deste trabalho em seu laboratório, por todos os conselhos e orientação para melhoria deste trabalho, pela sua disponibilidade em me ajudar sempre que preciso, pelas conversas e pelos vastos ensinamentos passados.

Aos professores **Dr<sup>a</sup>. Claudia Pessoa** e **Dr. Manoel Odorico de Moraes**, por permitir o desenvolvimento dos meus trabalhos anteriores no Laboratório Nacional de Oncologia experimental (LOE), onde fiz excelente amigos, e pela dedicação para proporcionar as melhores condições ao laboratório para o desenvolvimento das pesquisas de produtos naturais.

A **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marne Vasconcelos** primeiramente por ser a responsável por me apresentar a Paulinha e assim ter me proporcionado trabalhar com os produtos naturais marinhos e ter chegado até aqui, pelas conversas, conselhos e os momentos de descontração mesmo que tão “brutais”.

Ao amigo e agora **Prof. Dr. Diego Veras Wilke** por todos os seus ensinamentos passado durante toda essa minha vivência no laboratório, pelos conselhos, conversas, amizade, otimismo e contribuições para o trabalho.

A **Dr<sup>a</sup>. Maria da Conceição Menezes Torres (Ceixa)** pela ajuda de maneira decisiva na parte química e contribuição para este trabalho, pela amizade sincera, pelos vários momentos de descontração, conversas, convívio, pelo seu carisma, pelos conselhos e pela força nos momentos difíceis.

Ao **Prof. Dr. Tito Monteiro da Cruz Lotufo** por todo conhecimento transmitido durante toda essa minha vida acadêmica, pelo seu exemplo de profissional a ser seguido, por ter me apresentado o trabalho com produtos naturais marinhos realizados pela Profa. Letícia, por todas as excelentes aulas lecionadas, por ter se disposto a realizar a coleta do material para o desenvolvimento deste trabalho, pelos conselhos e ajuda com as análises filogenéticas do trabalho.

Aos meus amigos e integrantes e ex-integrantes da família Ecotox, Laboratório de Ecotoxicologia Marinha, **Allan Santos, Allyson Queiroz, Andressa Pâmela, Arinice Costa, Bianca Del Bianco, Breno Teles, Evelyne Alves, Evilá Damasceno, Fiamma Lemos, Karine Pires, Janaina Bernado, Janisi Aragão, Jeamylye Nilin, Lígia Santana, Livia Pitombeira, Líoiza Freitas, Lourdes Larissa, Luana Araújo, Lucas Buruaem, Marcela Davanso (Tchuca), Marcionília Pimentel, Paula Abreu (Paula IC), Renan Vandré (Daku)**, pelo convívio harmonioso dentro e fora do laboratório, tornando-o um lugar prazeroso para se trabalhar, pelos vastos momentos de descontração, momentos gordices, pela amizade sincera, pelas broncas, pelos conselhos, pela prontidão em ajudar e tornarem meus dias cada vez mais divertido e especial.

Um agradecimento em especial para minha amigona e iniciação científica rebelde, **Larissa Guimarães (#ICrebelde)**, pelo companheirismo durante toda essa jornada com os microrganismos marinhos, pelo aprendizado, pelas brincadeiras nos momentos de descontração, pela conversa científica, pela sua pronta ajuda sempre que necessária e até mesmo pelos atos de bullying que você vem causando só porque agora é doutoranda.

Aos amigos **Eduardo Freitas, Ronaldo Ruy e Felipe Rocha** por terem se disposto a ir coletar o material para a realização deste trabalho.

Aos amigos do LAFIPLAM, **Hozana Patricia, Thiciana Sousa, Karine Oliveria, Karisia Silva, Alisson Batista, Bruno Gomes, Max Barbosa**, por sempre prontos as sanar nossas duvidas, pelos ensinamentos da química, pelo brilhante trabalho com o processamento das nossas amostras, pelo convívio, colaboração e amizade.

Aos amigos, **Eduardo Freitas, Francisca Andréa, Ronaldo Ruy e Sandra Vieira** do Laboratório de Ecologia Animal (LECA), nosso laboratório irmão, pela convivência, pela receptividade para com nosso laboratório, pela amizade, conselhos e os conhecimentos passados.

Ao **Prof. Dr. Vicente Farias**, pelas contribuições dadas a este trabalho, pelas considerações feitas, pelos conselhos, pela sua pronta disposição em ajudar e participar das avaliações do trabalho.

Aos amigos do LEMBIOTECH, **Alysson Lira, Barbara Cibelle, Denise Hissa, Hotência Barroso, Júlio Ximenes, Leonardo Normado, Luina Benevides, Luis Henrique, Natália Falcão, Vanessa Nogueira, Wal Melgaço** pela receptividade, ensinamentos, pelas ajudas e dicas para este trabalho e pelo convívio agradável proporcionado por vocês durante minhas estadias no laboratório.

Em especial as minhas amigas de turma de mestrado e doutorado e agora doutoras **Tallita Tavares e Geórgia Bárguil**, pela amizade, por toda força dada durante esses anos, pelas conversas jogadas fora, pelos conselhos, pela ajuda neste trabalho e pelo apoio e ensinamentos.

Aos funcionários do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR), em especial a **Dona Célia, Francisco e Wagner**, por sempre trabalhar para dar condições para que este e outros trabalhos possam ser realizados.

A **Silvana França e Adelânia Roque** por desempenharem de forma tão impecável os seus trabalhos, pelos vários momentos de conversa e descontração, por toda atenção e ajuda dedicada a mim quando preciso.

Aos meus eternos amigos e integrantes do grupo “Risca Faca”, **Ailton Fontenele, Andrew Sá, Carla Sombra, Danilo Rocha, Gardênia Militão, Ivana Dantas, Patrícia Marçal, Paulo Michel**, pessoas pelas quais guardo uma eterna admiração, afeto e consideração, pelos incontáveis momentos de amizade incondicionais vividos dentro e fora do laboratório, sempre prontos a ajudar quando necessário, pelos vários momentos de descontração e bohemia durante feijoadas, churrascos e festas noite a fora e pelas muitas histórias para contar.

Aos meus amigos que fazem ou fizeram parte do meu convívio no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental (LOE) durante meus anos de graduação e mestrado, **Adriana Carvalho, Ana Jérсия, Assuero Meira, Bruno Cavalcanti, Bruno Soares, Cecília Oliveira, Daniel Pascoalino, Daniel Pereira Bezerra, Delano Marinho, Dayse Jereissate, Gabriella Vieira, Hemerson Yuri, José Roberto, Kristiana Mousinho, Marcos Angelim, Washington Barros**, pela amizade, pela convivência no dia a dia, os vários momentos de descontração, aprendizado, conselhos e ajuda quando necessária.

As minhas recentes amigas **Cilene Sousa, Stela Frota, Saskia Monteiro e Maricya Oliveira** pela amizade, carinho, conselhos e momentos de pura descontração.

Aos meus amigos desde as épocas remotas do evolutivo (Evoamigos), **Francisco Jackson, Jackson Câmara, Lilianne Rodrigues e Phillippo Fernandes**, pela amizade durante todos esses anos, pelos conselhos, cumplicidade, apoio, aprendizado.

Aos amigos **Álisson Canafístula, Clayton Vidal “In memória”, Elton Saraiva, Felipe Schmitt e Igor Correia** por sempre estarem presentes durante esses anos, pelas farras que geraram milhões de histórias engraçadas para contar, pela amizade, pelos conselhos, pela força nos momentos difíceis e por proporcionar diversos momentos de alegria.

Aos amigos **Adriano Braga, Assis Pereira, Felipe Cavalcante, Hugo Pinheiro, Marcos Silva, Rogério Freitas e Tiago Nobre**, pelo convívio sempre agradável, pelos momentos de descontração, pelos conselhos e críticas, pelas palavras de incentivo, pelas conversas e por toda amizade.

As minhas grandes amigas, **Anna Rakel, Gardenia Militão, Ivana Dantas e Patricia Marçal e Patricia Mesquita (Paty Vidaloka)**, minhas queridas por quem tenho enorme consideração e afeto, pelos vários momentos de descontração proporcionados, pela companhia, pelos conselhos, as discussões calorosas e pela amizade incondicional.

As minhas queridas amigas, **Carla Sombra, Marisa Sombra e Paula Sombra** e família, sem distinção são as minhas “Sombras” queridas, por quem tenho grande admiração, pelo carinho, conselhos, eternos momentos de alegria, pelas nossas histórias juntos, pelo companheirismo e amizade absoluta.

Aos meus amigos **Ghislain Favé**, **Luis Wagner** e **Raphael Girão**, pela amizade, companheirismo, conversas, aprendizados e momentos de muito divertimento.

As minhas amigas queridas, **Rachel Santiago** e **Andréa Simplicio**, pela ajuda sempre que necessária, por todo o carinho, pelas conversas prazerosas, companheirismo e claro, pela amizade sempre sincera.

Aos meus amigos do mestrado, **Ricardo Albuquerque (Ricardim)** e **Otávio Serino**, pela amizade incondicional, pelos conselhos, momentos de estudo descontraídos, pelas farras e momentos hilários, quase sempre promovidos pelo Ricardim, e pela companhia para tomar aquele uísque ou aquela cerveja gelada sempre que estávamos de cabeça cheia.

Ao meu mais que amigo, quase irmão, **José Fábio** por toda força dada durante esses anos, incentivo, amizade irrefutável desde a época de colégio, carinho, convívio durante todos esses anos os quais nos fez crescer e amadurecer.

A minha mais que amiga, quase irmã, **Tereza Costa**, pela impecável amizade que tem por mim, pelos conselhos, pelas broncas, por toda paciência em me escutar, pelo carinho e afeto, pelas conversas, shows e palavras de incentivo.

A família Girão, **Santana Girão**, **Hendelácio Girão**, **Marcel Girão**, **Michelle Girão** e **Vanessa Girão**, meus vizinhos, por todo o carinho dado a mim, pela confiança, amizade acima de tudo e apoio em momentos cruciais da minha vida, pois és para mim como minha segunda família.

Ao mais que amigo, **Thiago Cândido**, gostaria de agradecer imensamente por todo o apoio dado durante a execução desse trabalho, por toda dedicação, apoio, carinho, preocupação, encorajamento, por me escutar sempre que preciso, pelos vastos momentos de descontração, pelo companheirismo, pelos conselhos, por sempre estar pronto a me dar forças quando precisei e pela amizade irrestrita.

A minha tão querida avó materna, **Rosa Amélia**, por todos esses anos de dedicação a minha criação, por estar sempre presente na minha educação, pelo carinho, pelo exemplo de perseverança e muitas outras coisas que me faltam palavras para descrever.

Aos meus pais, **Regina Célia** e **Francisco de Assis**, que mesmo separados sempre estiveram unidos para me proporcionar a melhor educação, sempre apoiando minhas decisões e proporcionando ser hoje a pessoa que sou.

A minha irmã **Leticia Gois**, que apesar de ser na grande maioria das vezes contra a sua forma de pensar e todas nossas brigas, amo esta pessoa incondicionalmente.

Aos meus amados tios, **Regina Lúcia** e **Carlos Moraes**, por todo amor e carinho a mim dado, pela ajuda sempre que necessária, pelos conselhos, compreensão, incentivos e exemplo de pessoas.

As minhas primas queridas **Priscila Karla** e **Patricia Karla**, por todo carinho, amor, preocupação e afeto para com a minha pessoa.

Aos demais familiares e amigos que sempre torceram e acreditaram em mim.

Ao **CNPq** pelo financiamento do projeto e o apoio financeiro atribuído ao desenvolvimento e efetivação desse trabalho.

A **CAPES** pelo apoio financeiro durante parte desse trabalho.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.” *Madre Teresa de Calcuta*

## RESUMO

Microrganismos marinhos são reconhecidos por sua capacidade de sintetizar moléculas bioativas com estruturas únicas e mecanismos de ação peculiares. O presente trabalho realizou um estudo sobre a diversidade biológica e potencial biotecnológico de microrganismos recuperados de amostras dos sedimentos do Arquipélago São Pedro e São Paulo (ASPSP), localizado a quase mil quilômetros da costa brasileira. As amostras de sedimento foram processadas para isolamento dos microrganismos cultiváveis e para estimativa da diversidade microbiana a partir da análise do ADN metagenômico. As culturas isoladas foram crescidas em meio líquido para extração com solventes orgânicos e posterior caracterização da atividade citotóxica em células de adenocarcinoma humano (HCT-116) e do perfil químico por cromatografia líquida seguida de espectrometria de massas (CL-EM) e posterior análise na base de dados *AntiMarin*. O estudo preliminar da diversidade de grupos de Bacteria e Archaea através das técnicas de DGGE realizado para as amostras do primeiro (E1) e segundo semestre (E2) mostraram que existe uma semelhança acentuada de 62,8% para o grupo das bactérias, enquanto para o Archaea, a similaridade foi de 32,9%. Ao todo foram obtidos 61 UTOs de bactérias e 32 UTOs para Archaea. Em relação às bactérias cultiváveis, um total de 268 estirpes de bactérias foi recuperado a partir das 21 amostras de sedimentos recolhidos. Na avaliação da atividade biológica, 41 extratos demonstraram citotoxicidade, com  $CI_{50}$  variando entre 0,04 e 31,55  $\mu\text{g/mL}$ . A partir desse resultado, três bactérias foram escolhidas para o fracionamento bioguiado dos compostos ativos. No extrato da BRA-132, identificada como *Salinispora* sp., foram identificados compostos bioativos do grupo das estaurosporinas além da saleniketais e rifamicina. Do extrato da BRA-199, identificada como *Streptomyces* sp., foram isoladas três dicetopiperazinas, entretanto nenhuma delas demonstrou atividade citotóxica, além dos compostos citotóxicos piericidina A e glicopiericidna A. Já da BRA-177, identificada como *Actinomadura* sp., foram isoladas moléculas do grupo das prodigiosinas, ciclononilprodigiosina e nonilprodigiosina, que apresentam potente atividade citotóxica. Esses resultados demonstram que, apesar da baixa diversidade observada pelo DGGE, as bactérias cultiváveis do ASPSP apresentam elevado potencial biotecnológico.

Palavras-chave: Microrganismos Marinhos; Prospecção ; Anticâncer; Arquipélago  
São Pedro e São Paulo

## ABSTRACT

Marine organisms are recognized for their ability to synthesize bioactive molecules with unique mechanisms of action peculiar structures. This study conducted a study about the biological diversity and biotechnological potential of microorganisms recovered from sediment samples St. Peter and St. Paul Archipelago (SPSPA) located almost a thousand miles from the Brazilian coast. The sediment samples were processed for isolation of cultivable microorganisms and to estimating microbial diversity based on the analysis of metagenomic DNA. The isolated cultures were grown on broth medium for the extraction with organic solvents and subsequent characterization of cytotoxic activity on human adenocarcinoma cells (HCT-116) and the chemical profile by liquid chromatography followed by mass spectrometry (LC-MS) and subsequent analysis on the basis of *AntiMarin* data. The study of diverse groups of bacteria and archaea through the DGGE techniques performed to the samples of the first (E1) and second semester (E2) showed that there is a marked similarity of 62.8% to the group of bacteria, whereas for Archaea, the similarity was 32.9%. In total 61 UTOs from bacteria and Archaea were obtained for 32 OTUs. In relation to cultivable bacteria a total of 268 strains of bacteria was recovered from the 21 samples collected sediment. In the evaluation of biological activity, 41 extracts showed cytotoxicity, with  $IC_{50}$  ranging from 0.04 to 31.55  $\mu\text{g/mL}$ . From this result, three bacteria were chosen for bioguided fractionation of the active compounds. In the extract of BRA-132, identified as *Salinispora sp.*, were identified bioactive compounds the group of staurosporines beyond saleniketals and rifamycin. Extract the BRA-199, identified as *Streptomyces sp.*, were isolated three diketopiperazines, however none of them showed cytotoxic activity in addition to cytotoxic activity piericidin A and A glycol-piericidin A. Already BRA-177, identified as *Actinomadura sp.*, were isolated the molecules cyclononilprodigiosin and nonilprodigiosin of the group prodigiosins, which have potent cytotoxic activity were isolated. These results demonstrate that, despite the low diversity observed by DGGE, the culturable bacteria SPSPA have high biotechnological potential.

Key words: Marine microorganisms; diversity; anticancer; St. Peter and St. Paul Archipelago

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 01** - Mapa representativo da biodiversidade marinha do planeta Terra apresentando os resultados obtidos pelo projeto Censo da vida Marinha. <http://comlmaps.org/oceanlifemap/past-present-future>. Acessado em: 22/06/2014..... **01**
- Figura 02** - Figura esquemática apresentando a diversidade genética, biológica e química existente no ambiente marinho..... **02**
- Figura 03** - Percentual de novos produtos naturais marinhos isolados de invertebrados entre os anos de 2000 a 2009. (Adaptado de Leal et al., 2012)..... **03**
- Figura 04** - Estrutura química de compostos isolados de invertebrados marinhos que atualmente encontram-se em uso clínico..... **06**
- Figura 05** - Estrutura química da Salinosporamida A, isolado da espécie marinha *S. tropica*..... **12**
- Figura 06** - Mapa da localização geográfica do arquipélago São Pedro e São Paulo localizado no Oceano Atlântico equatorial, N00°55.1', W29°20.7', cerca de 1010 km a ENE da cidade de Natal, capital do estado de Rio Grande do Norte (RN)..... **18**
- Figura 07** - Métodos empregados no isolamento de bactérias de sedimentos do Arquipélago de São Pedro e São Paulo..... **24**
- Figura 08** - Método empregado na criopreservação das bactérias recuperadas do sedimento do Arquipélago de São Pedro e São Paulo..... **25**
- Figura 09** - Fluxograma com a obtenção dos extratos orgânicos oriundos do fermentado biológico das cepas de bactérias recuperados do sedimento coletado no arquipélago São Pedro e São Paulo..... **26**
- Figura 10** - Cromatograma representativo da obtenção das subfrações obtidas da fração BRA-132(E-J) através de HPLC..... **29**
- Figura 11** - Fluxograma referente ao fracionamento químico do extrato bruto obtido do fermentado biológico da cepa BRA-132..... **30**
- Figura 12** - Fluxograma do fracionamento químico do extrato orgânico obtido da fermentação biológica em larga escala da cepa BRA-199..... **32**

<b>Figura 13</b> - Fluxograma do fracionamento químico do extrato acetato de etila obtido da cepa BRA-177.....	<b>34</b>
<b>Figura 14</b> - Perfil das comunidades de <i>Bacteria</i> e <i>Archaea</i> obtidos a partir do perfil de bandas do gel de DGGE do <i>pool</i> de sedimentos coletados em diferentes períodos de coleta.....	<b>39</b>
<b>Figura 15</b> - Diagramas de Venn representando a riqueza de UTOs das comunidades de <i>Bacteria</i> e <i>Archaea</i> entre os diferentes períodos de coleta.....	<b>40</b>
<b>Figura 16</b> - Gráfico em pizza ilustrando o número de colônias isoladas utilizando as metodologias do carimbo (M1) (A) e diluição (M2) (B) para os três diferentes meios de cultura aplicados.....	<b>41</b>
<b>Figura 17</b> - Gráfico ilustrando o percentual de extratos orgânicos ativos obtidos do fermentado biológico das cepas recuperadas das 21 amostras de sedimento do ASPSP.....	<b>42</b>
<b>Figura 18</b> - Compostos identificados através da caracterização química dos extratos ativos por CL-EM e confirmação no banco de dados <i>Antimarin</i> .....	<b>44</b>
<b>Figura 19</b> - Cladograma mostrando o agrupamento das cepas de bactérias que apresentaram atividade citotóxica, recuperadas das 21 amostras de sedimento coletadas no ASPSP.....	<b>46</b>
<b>Figura 20</b> - Árvore filogenética para as sequências de RNAr 16S da cepa BRA-132 e as sequências mais similares encontradas no banco de dados EzTaxon-e. Valores de <i>bootstrap</i> para os nódulos são mostrados.....	<b>47</b>
<b>Figura 21</b> - Árvore filogenética para as sequências de RNAr 16S da cepa BRA-199 e as sequências mais similares encontradas no banco de dados EzTaxon-e. Valores de <i>bootstrap</i> para os nódulos não são mostrados, pois estavam abaixo de 70%.....	<b>52</b>
<b>Figura 22</b> - Estrutura química das dicetopiperazinas isoladas da cepa BRA-199 ( <i>Streptomyces</i> sp.) recuperada das amostras de sedimento do ASPSP.....	<b>57</b>
<b>Figura 23</b> - Árvore filogenética para as sequências de RNAr 16S da cepa BRA-177 e as sequências mais similares encontradas no banco de dados EzTaxon-e. Valores de <i>bootstrap</i> para os nódulos são mostrados.....	<b>58</b>
<b>Figura 24</b> - Estrutura química dos derivados de prodigiosina isolados das frações ativas da cepa BRA-177.....	<b>60</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01</b> - Compostos isolados de organismos marinhos e seus derivados atualmente aprovados pelo <i>Food and Drug Administration</i> (FDA) e em fase de estudos pré-clínicos (Adaptado de Gerwick & Moore, 2011; Mayer <i>et al.</i> , 2010). N.A - Não apresenta.....	<b>05</b>
<b>Tabela 02</b> - Fracionamento do extrato bruto da cepa BRA-132 obtido do crescimento em larga escala (10L).....	<b>28</b>
<b>Tabela 03</b> - Fracionamento do extrato bruto da cepa BRA-199 obtido do crescimento em larga escala (10L).....	<b>31</b>
<b>Tabela 04</b> - Fracionamento do extrato bruto da cepa BRA-177 obtido do crescimento em larga escala (10L).....	<b>33</b>
<b>Tabela 05</b> - Fracionamento da fração ativa, BRA-177E, por coluna cromatografiada de C-18.....	<b>34</b>
<b>Tabela 06</b> - Atividade citotóxica dos extratos orgânicos obtidos em cultura de células HCT-116 avaliadas pelo ensaio do MTT após 72hs de incubação. Os valores representam suas respectivas $CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) e intervalo de confiança de 95% (IC95%). Doxorrubicina utilizada como controle positivo para o ensaio.....	<b>43</b>
<b>Tabela 07</b> - Caracterização dos extratos ativos obtidos da cultura de microrganismos isolados do ASPSP por CL-EM combinado com análise dos dados de massa obtidos pelo banco de dados do <i>AntiMarin</i> .....	<b>45</b>
<b>Tabela 08</b> - Atividade citotóxica das frações derivadas do extrato acetado de etila obtido do fermentado biológico da cepa BRA-132 em cultura de células HCT-116 avaliadas pelo ensaio do MTT, 72h. $CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ), IC 95%.....	<b>48</b>
<b>Tabela 09</b> - Percentual de inibição da proliferação celular de células tumorais da linhagem HCT-116 <i>in vitro</i> das subfrações obtidas da fração BRA-132(E-J) avaliadas pelo ensaio do MTT após 72h de incubação na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ .....	<b>49</b>
<b>Tabela 10</b> - Atividade citotóxica das subfrações derivadas das frações BRA-132(E-J/1), BRA-132(E-J/4) e BRA-132(E-J/5-6) em cultura de células da linhagem HCT-116, avaliadas em dose única de 50 $\mu\text{g/mL}$ e diluições seriadas através ensaio do MTT com 72h de incubação.....	<b>50</b>

<b>Tabela 11</b> - Inibição da proliferação celular da linhagem tumoral de adenocarcinoma de cólon (HCT-116) pelas frações obtidas do extrato orgânico da cepa BRA-199 ( <i>Streptomyces</i> sp.) EPM – Erro Padrão da Média.....	<b>53</b>
<b>Tabela 12</b> - Inibição da proliferação celular pelas frações obtidas do extrato bruto da cepa BRA-199 ( <i>Streptomyces</i> sp.) observada pelo ensaio do MTT, utilizando-se a linhagem de célula tumoral HCT-116.....	<b>54</b>
<b>Tabela 13</b> - Inibição da proliferação celular <i>in vitro</i> da linhagem de adenocarcinoma humano (HCT-116) pelas subfrações obtidas da fração BRA-199B5 através ensaio do MTT.....	<b>55</b>
<b>Tabela 14</b> - Atividade citotóxica das dicetopiperazinas isoladas do extrato orgânico da cepa BRA-199 ( <i>Streptomyces</i> sp.). A atividade foi avaliada através do ensaio do MTT após 72h de incubação. A $CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) e $IC_{95\%}$ calculadas por regressão não-linear.....	<b>55</b>
<b>Tabela 15</b> - Atividade citotóxica <i>in vitro</i> na linhagem HCT-116, do extrato bruto da cepa BRA-177 e sua frações, avaliados pelo ensaio do MTT após 72h de incubação. .....	<b>59</b>

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>%IC</b>	Percentual inibitório do crescimento
<b>AcOEt</b>	Acetato de etila
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>Ara-A</b>	Vidarabina
<b>Ara-C</b>	Citarabina
<b>ASPSP</b>	Arquipélago São Pedro e São Paulo
<b>CC</b>	Coluna cromatográfica
<b>CCD</b>	Cromatografia em camada delgada
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentração inibitória media
<b>CTAB</b>	Brometo de cetil-trimetilamônio
<b>DCM</b>	Diclorometano
<b>DGGE</b>	Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante
<b>DMSO</b>	Dimetilsufóxido
<b>ECASPSP</b>	Escola Científica do Arquipélago São Pedro e São Paulo
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetracético
<b>HRESIMS</b>	High-resolution electrospray ionisation mass spectrometry (Espectrometria de massa de alta reolução com ionização por <i>electrospray</i> )
<b>EtOH</b>	Álcool etílico
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>HCl</b>	Ácido clorídrico
<b>Hex</b>	Hexano
<b>IC95%</b>	Intervalo de confiança de 95%
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>LACG</b>	Linfoma anaplásico de células grandes
<b>CL-EM</b>	Cromatografia Líquida – Espectrometria de massa

<b>LH</b>	Linfoma de Hodgkin refratário ou recorrente
<b>mAb</b>	Monoclonal antibody (Anticorpo monoclonal)
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>MMAE</b>	Monometila auristatina E
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimetiltiazol-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazolina bromide
<b>NCI</b>	National Cancer Institute
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
<b>ADNr</b>	Ácido desoxirribonucleico ribossomal
<b>SCA</b>	Starch Casein Agar (Amido caseína ágar)
<b>SPE</b>	Extração em fase sólida
<b>SWA</b>	Sea Water Agar (Água do mar ágar)
<b>TE</b>	Tampão de eluição
<b>TMA</b>	Traces Metals Agar (Metais traços ágar)
<b>Tris</b>	Tris(hidroximetil)aminometano
<b>UFC</b>	Unidade Formadora de Colônias
<b>CLAE</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>UBO</b>	Unidade Biosintética Operacional
<b>UTO</b>	Unidade Taxonômica Operacional
<b>UVP</b>	Fotodocumentação Ultravioleta

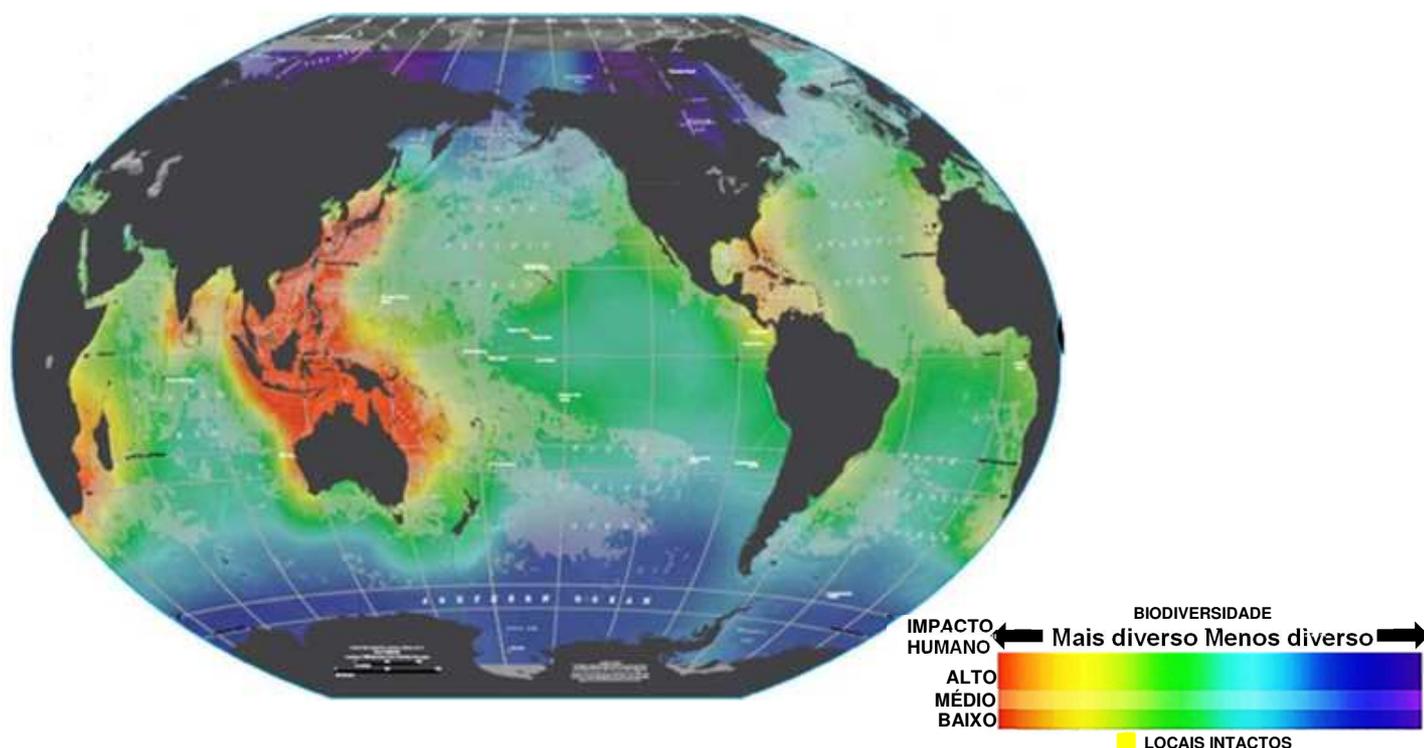
## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>01</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>17</b>
2.1. Objetivo geral	17
2.2. Objetivos específicos	17
<b>3. METODOLOGIAS</b>	<b>18</b>
3.1. Área de estudo	18
3.2. Coleta do material	19
3.3. Extração e purificação do ADN total	20
3.3.1. Extração do ADN	20
3.3.2. Purificação do ADN total	20
3.3.3. Amplificação do ADN total e DGGE	21
3.3.4. Análise dos dados	22
3.4. Processamento das amostras para isolamento dos microrganismos cultiváveis	23
3.5. Isolamento dos microrganismos	24
3.6. Purificação, cultivo e criopreservação dos microrganismos	24
3.7. Obtenção dos extratos	25
3.8. Caracterização química dos extratos ativos	26
3.9. Crescimento em larga escala das cepas BRA-132; BRA-199 e BRA-177	27
3.10. Fracionamento bioguiado	27
3.10.1. Fracionamento químico da cepa BRA-132	28
3.10.2. Fracionamento químico da cepa BRA-199	31
3.10.3. Fracionamento bioguiado da cepa BRA-177	33
3.11. Determinação da atividade citotóxica	35
3.11.1. Ensaio do MTT	35
3.11.2. Análise Estatística	36
3.12. Identificação molecular	36
3.12.1. Extração do ADN genômico	36
3.12.2. PCR do ADN genômico	37
3.7.3. Análise dos dados e Identificação Molecular	38

<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>39</b>
<b>4.1. Estudos baseados em perfis de ARNr 16S</b> .....	<b>39</b>
<b>4.1.1. Perfil da comunidade microbiana obtida através dos dados de DGGE</b> .....	<b>39</b>
<b>4.2. Isolamento e purificação dos microrganismos</b> .....	<b>40</b>
<b>4.3. Avaliação da citotoxicidade dos extratos brutos</b> .....	<b>41</b>
<b>4.4. Caracterização química dos extratos ativos</b> .....	<b>44</b>
<b>4.5. Identificação molecular das cepas ativas</b> .....	<b>46</b>
<b>4.6. Estudo químico da cepa BRA-132 (<i>Salinispora sp.</i>)</b> .....	<b>47</b>
<b>4.6.1. Identificação molecular da cepa BRA-132</b> .....	<b>47</b>
<b>4.6.2. Fracionamento bioguiado da cepa BRA-132</b> .....	<b>48</b>
<b>4.6.3. Identificação dos compostos bioativos da cepa BRA-132</b> .....	<b>50</b>
<b>4.7. Estudo químico da cepa BRA-199 (<i>Streptomyces sp.</i>)</b> .....	<b>51</b>
<b>4.7.1. Identificação molecular da cepa BRA-199</b> .....	<b>51</b>
<b>4.7.2. Fracionamento bioguiado da cepa BRA-199</b> .....	<b>53</b>
<b>4.7.3. Isolamento das moléculas bioativas da BRA-199</b> .....	<b>56</b>
<b>4.8. Estudo químico da cepa BRA-177 (<i>Actinomadura sp.</i>)</b> .....	<b>58</b>
<b>4.8.1. Identificação molecular da cepa BRA-177</b> .....	<b>58</b>
<b>4.8.2. Fracionamento bioguiado da cepa BRA-177</b> .....	<b>59</b>
<b>4.8.3. Caracterização e isolamento dos compostos ativos da cepa BRA-177</b> .....	<b>60</b>
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>61</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>79</b>
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>80</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>81</b>
<b>ANEXO I (Equipamentos e soluções)</b> .....	<b>104</b>
<b>ANEXO II (Meios de cultura para microbiologia)</b> .....	<b>111</b>
<b>ANEXO III (Dados químicos dos compostos)</b> .....	<b>112</b>

## 1. Introdução

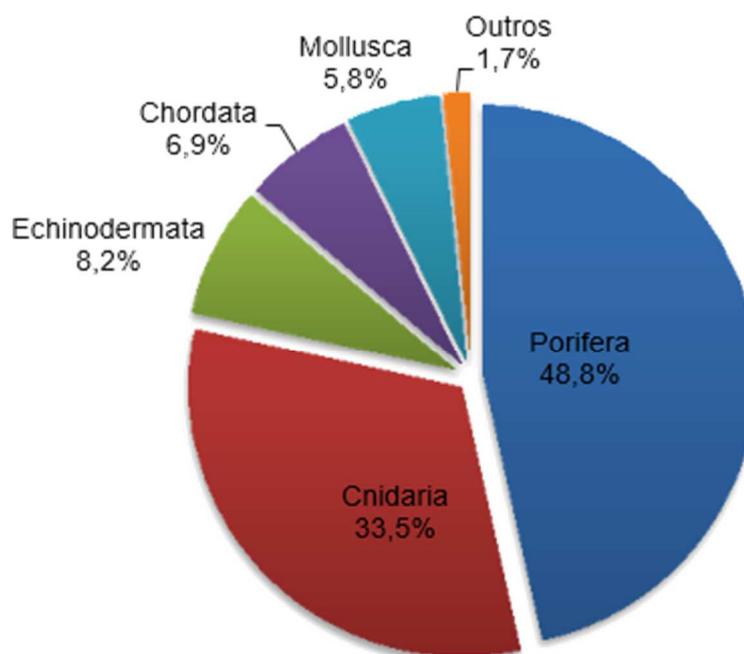
Os mares e oceanos compreendem a maior porção da esfera terrestre (71%), abrigando em suas diferentes regiões mais de 90% da biodiversidade do planeta entre macro e microrganismos. Estudos recentes realizados por pesquisadores do projeto Censo da Vida Marinha estimam que existam cerca de um milhão de macrorganismos e dezenas de milhões de microrganismos nos mares e oceanos (JIMENO et al., 2004; HILL e FENICAL, 2010; *Census of Marine life*. Disponível em: < <http://www.coml.org/>>. Acessado em 04/05/2014). A figura 01 mostra os primeiros resultados desse projeto, onde podemos observar que o litoral brasileiro figura como uma área de diversidade intermediária quando comparada, por exemplo, a área da Indonésia, tida como berço da diversidade marinha (Censo da vida Marinha, 2014). É importante ressaltar que o Brasil é considerado como um dos países que menos conhecem e protegem sua diversidade marinha (Figura 01).



**Figura 01** - Mapa representativo da biodiversidade marinha do planeta Terra apresentando os resultados obtidos pelo projeto Censo da vida Marinha. <http://comlmaps.org/oceanlifemap/past-present-future>. Acessado em: 22/06/2014.

Toda essa diversidade biológica atrelada a um ambiente de intensas pressões ecológicas, como predação e competição por espaço, resulta numa variedade de metabólitos com alta solubilidade em água (HESTER, HARRISON e BIGG, 2000).





**Figura 03** - Percentual de novos produtos naturais marinhos isolados de invertebrados entre os anos de 2000 a 2009. (Adaptado de Leal et al., 2012).

A ausência de equipamentos (*scuba diving*) e o difícil acesso ao ambiente marinho foram os principais motivos pelos quais este ecossistema foi tardiamente explorado. Os estudos com produtos naturais marinhos foram iniciados a partir da década de 50, cujo marco inicial foi o trabalho dos pesquisadores Bergman & Feeney, o qual isolaram os arabinucleosídeos espongouridina e espongotimidina da esponja marinha *Cryptotethya crypta*, marcando assim, o início dos estudos de química dos produtos naturais marinhos (NEWMAN E CRAGG, 2012; FENICAL, 2006; BERGMANN e BURKE, 1956; BERGMANN e FEENEY, 1951).

Esses nucleosídeos isolados serviram de protótipo para o desenvolvimento dos compostos análogos, Vidarabina, Vidarabin Thilo® (Ara-A) e Citarabina, Alexan®, Udacil® (Ara-C) sendo estes, os primeiros compostos de origem marinha utilizados na clínica para o tratamento de doenças virais e tumores, respectivamente (BERGMANN e STEMPIEN, 1957; PROKSCH, EDRADA e EBEL, 2002).

Apenas na década de 70 que o ambiente marinho ganhou mais ênfase, devido a grande pressão a fim de descobrir novas drogas com potencial farmacológico para o tratamento de enfermidades. Durante esta década, os invertebrados marinhos, esponjas, corais moles e ascídias, ganharam destaque devido à grande abundância e à facilidade de coleta (PROKSCH, EDRADA e EBEL, 2002).

A década de 80 foi marcada pelo isolamento do depsipeptídeo cíclico Dideminina B e a entrada deste composto para a fase I de ensaios clínicos para atividade antitumoral pelo NCI, sendo esta, a primeira molécula de origem marinha a ser testada clinicamente (CHUN et al, 1986). Isso tornou mais evidente o potencial químico e farmacológico dos mares e oceanos (PROKSCH, EDRADA e EBEL, 2002; POMPONI, 2001; FENICAL, 1997).

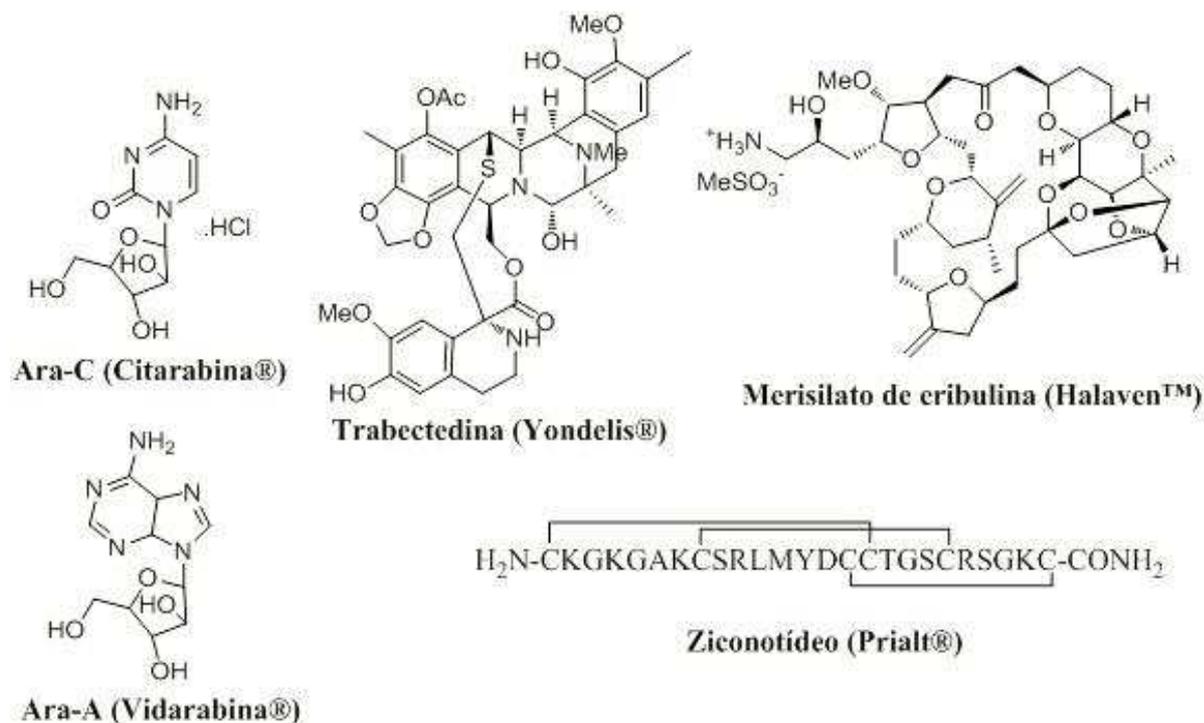
Desde então, o ecossistema marinho é considerado uma fonte bastante promissora para a prospecção de novas moléculas biologicamente ativas com potencial biomédico. Até o presente momento já se isolou, principalmente de invertebrados, mais de 15.000 novos compostos com estruturas peculiares e bastante complexas. Essas moléculas tornam-nas fortes candidatas para o desenvolvimento de novos fármacos por apresentarem mecanismos de ação inusitados, alta seletividade e diversidade de alvos moleculares (LEAL et al., 2012; RADJASA et al., 2011; JIMENEZ, MÁRIA ŠTURDÍKOVÁ e ŠTURDÍK; 2009).

Atualmente sete compostos encontram-se aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para a comercialização (Tabela 1), treze compostos encontram-se em fase de testes clínicos e mais de mil compostos isolados de organismos marinhos encontram-se em fase de estudos pré-clínicos (GERWICK e MOORE, 2012; IMHOFF, LABES e WIESE, 2011; MONTASER e LUESCH, 2011).

**Tabela 1** - Compostos isolados de organismos marinhos e seus derivados atualmente aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA) e em fase de estudos pré-clínicos (Adaptado de Gerwick & Moore, 2011; Mayer et al., 2010). N.A - Não apresenta.

Status	Nome	Nome comercial	Organismo Marinho	Classe Química	Mecanismo de ação	Aplicação
Aprovado pelo FDA	Citarabina (ARA-C)	Cytosar-U®	Esponja	Nucleosídeo	DNA polimerase	Câncer
	Vidarabina (ARA-A)	Vira-A®	Esponja	Nucleosídeo	DNA polimerase viral	Antiviral
	Ziconotídeo	Prialt®	Molusco	Peptídeo	Canais de Ca <sup>2+</sup> tipo N	Dor
	Trabectedina	Yondelis®	Tunicado	Alcalóide	Sulco menor do ADN	Câncer
	Brentuximab vedotina	Adcetris®	Molusco/ cianobactéria	Anticorpo conjugado	CD30 e Microtúbulos	Câncer
	Ácidos ômega-3	Lovaza®	Peixe	Ácido graxo ômega-3	Enzimas da síntese dos triglicerídeos	Hipertriglicemia
	Mesilato de eribulina	Halaven®	Esponja	Macrolídeo	Microtúbulos	Câncer
Fase III	Plitidepsina	Aplidina®	Tunicado	Depsipeptídeo	Antimitótica	Câncer
	Tetrodotoxina	Tectin®	Peixe	Alcalóide guanidínico	Canais de Na <sup>+</sup>	Dor
	Soblidotina	TZT-1027	Tunicado	Peptídeo	Microtúbulos	Câncer
Fase II	DMXBA (GTS-21)	N/A	Verme	Alcalóide	Receptor $\alpha$ 7 Nicotínico acetilcolina	Esquizofrenia
	PM00104	Zalypsis®	Molusco	Alkaloid	Ligação com ADN	Câncer
	PM01183	NA	Tunicado	Alkaloid	Sulco menor do ADN	Câncer
	CDX-011	N/A	Molusco/ cianobactéria	Anticorpo conjugado	Glicoproteína NMB & Microtúbulos	Câncer
Fase I	Salinosporamida A; NPI-0052	Marizomib	Bactéria	$\beta$ -lactona-gama lactama	Inibidor de proteasoma 20S	Câncer
	PM060184	NA	Esponja	Policetídeo	Sulco menor do ADN	Câncer
	Briostatina	NA	Briozoário	Lactona macrolídio	Proteína Quinase C	Câncer
	SGN-75	NA	Molusco/ cianobactéria	Anticorpo conjugado	CD70 & microtúbulos	Câncer
	ASG-5ME	NA	Molusco/ cianobactéria	Anticorpo conjugado	ASG-5 & microtúbulos	Câncer

Dentre os compostos em uso clínico, tem-se o ARA-A (Thilo<sup>®</sup>) e o ARA-C (Alexan<sup>®</sup>, Udacil<sup>®</sup>), ziconotídeo (Prialt<sup>®</sup>), trabectedina (Yondelis<sup>®</sup>), brentuximab vedotina (Adcetris<sup>®</sup>) ácidos graxo ômega-3 (Lovaza<sup>®</sup>) e o mesilato de eribulina (Halaven<sup>™</sup>) (Figura 04). A Figura 04 ilustra a estrutura de alguns desses compostos.



**Figura 04** - Estrutura química de compostos isolados de invertebrados marinhos que atualmente encontra-se em uso clínico.

A citarabina ou citosina-arabinosídeo (ARA-C) é uma molécula que teve como protótipo a espongotimidina. Este composto é utilizado na clínica para terapia anticâncer, principalmente no tratamento da leucemia linfocítica aguda, leucemia mielóide aguda, em fases de crise blástica de leucemia mielóide crônica e leucemia meníngea. O composto atua principalmente na fase S do ciclo celular causando a inibição da ADN polimerase e da síntese de ADN (MAYER et al., 2010; THOMAS, 2009; PROKSCH, EDRADA e EBEL, 2002).

A vidarabina ou adenina-arabinosídeo (ARA-A) é um nucleosídeo desenvolvido a partir da espongouridina. É um antiviral inibidor da ADN polimerase e da síntese do ADN de vírus, utilizado para o tratamento de doenças oculares causada pelos vírus *Herpes simplex* tipo 1 e 2, doenças causadas pelos vírus *Vaccinia* e *Varicella zoster* (THOMPSON e WHITLEY, 2011; ABSALON e SMITH, 2009; WHITLEY, 2004; PROKSCH, EDRADA e EBEL, 2002; WHITLEY et al., 1980).

O ziconotídeo Prialt<sup>®</sup> é um peptídeo formado por 25 aminoácidos isolado do molusco *Conus magus*. Este composto é uma  $\omega$ -conotoxina utilizada na captura do alimento pelo organismo causando paralisação da presa. O ziconotídeo, aprovado pelo FDA em 2004, é um analgésico neuropático com mecanismo de ação inédito, capaz de bloquear de forma reversível os canais de cálcio do tipo N e tipo C (Figura 04) (PROMMER, 2005; MILJANICH, 2004; BOWERSOX e LUTHER, 1998).

O potencial antinociceptivo do ziconotídeo é mil vezes mais potente que a morfina e o tratamento com este composto é aplicado a pacientes com câncer e AIDS que apresentam dor crônica severa em seu quadro clínico, e manifestam resistência aos opióides. Diferente dos opióides, o ziconotídeo não apresenta tolerância e não gera dependência aos pacientes que o utilizam (McGIVERN, 2006; WANG et al., 2000; STAATS et al., 2004).

A trabectedina ou ET-743 é um alcaloide tetra-hidroquinolínico isolado da ascídia *Ecteinascidia turbinata* encontrada nos mares do caribe e do mediterrâneo. Este composto foi o primeiro agente anticâncer marinho a ser aprovado pela União Européia para o tratamento de pacientes com sarcoma de tecido mole, e pacientes com carcinoma de ovário sensíveis à platina (Figura 04) (VERWEIJ, 2009; SIMMONS et al., 2005; RINEHART et al., 1990). Atualmente, a trabectedina encontra-se em ensaios de fase II para tratamento dos cânceres de mama, pulmão, próstata e câncer pediátrico, e ensaios de fase III para a terapia de primeira linha para sarcoma de tecido mole.

A trabectedina alquila a molécula de ADN, porém o composto apresenta uma peculiaridade quanto ao seu mecanismo de ação. A molécula difere da grande maioria dos outros agentes alquilantes disponíveis no mercado, pois promove o dobramento da dupla fita da molécula de ADN ao se ligar a guanidina em sequências específicas de bases localizadas nos sulcos menores da dupla hélice (YAP, CARDEN e KAYE, 2009; ZEWAIL-FOOTE e HURLEY, 2001; SOARES et al., 2007). Esta ligação provoca uma desorganização do citoesqueleto, bloqueio da divisão celular e interferência no reconhecimento dos fatores de transcrição ou proteínas ligantes do ADN causando assim ativação ou inibição de determinados genes (YAP, CARDEN e KAYE, 2009; ZEWAIL-FOOTE e HURLEY, 2001; SOARES et al., 2007).

O brentuximab vendotina ou Adcetris<sup>®</sup> é um anticorpo monoclonal cAC10 conjugado com uma dolastatina 10 sintética denominada de monometila auristatina E (MMAE), possuindo potente atividade citotóxica contra linhagens de células tumorais humanas. O conjugado Adcetris<sup>®</sup> tem como alvo a proteína de membrana CD30 que está super-expressa em vários tipos de cânceres (FRANCISCO et al., 2003; DORONINA et al., 2003; ERBA et al., 2001).

O SNG-35 é formado pelo anticorpo monoclonal (mAb) ligado ao dipeptídeo valina-citrulina, que permite maior estabilidade no plasma a molécula e é facilmente hidrolisado pelas enzimas lisossomais, este por sua vez está ligado a um espaçador (PABC) ligado ao MMAE (ZHENG, et al., 2013; DORONINA et al., 2003;).

O Adcetris<sup>®</sup>, comercializado pela indústria *Seattle Genetics*, foi aprovado pelo FDA em agosto de 2011 para o tratamento de pacientes com linfoma de Hodgkin refratário ou recorrente (LH) e linfoma anaplásico de grandes células (LACG). O SGN-35 após ligar-se a proteína CD-30 é rapidamente internalizado pela célula sendo transportado para os lisossomos onde a molécula de MMAE é liberada ligando-se a tubulina, provocando uma parada no ciclo celular, levando as células à morte por apoptose (SENER e SIEVERS, 2012; VAN de DONK e DHIMOLEA, 2012; CHEN, SOMA e FROMM, 2014; MINICH, 2012; OKI e YOUNES, 2012).

O mesilato de eribulina ou Halaven<sup>®</sup>, aprovado pelo FDA em 2010, é uma cetona macrocíclica análogo da halicondrina B, isolada da esponja marinha *Halicondria okadai*. O mesilato de eribulina apresenta o mesmo mecanismo de ação e as mesmas propriedades biológicas promissoras da molécula natural, assim como as características farmacêuticas adequadas, incluindo a solubilidade da água e estabilidade química (Figura 04) (JACKSON, HENDERSON e PHILLIPS, 2009; GERWICK e MOORE, 2012).

O Halaven<sup>®</sup> é um potente agente antimetabólico, que promove a inibição da polimerização dos microtúbulos através da ligação com a tubulina. O composto tem apresentado um aumento na sobrevivência de pacientes com câncer de mama e câncer de mama metastático que tenham sido submetidos pelo menos a dois regimes de quimioterapia (MENIS e TWELVES, 2011).

Conforme apresentado na tabela I, existem vários outros compostos em fases de teste clínicos, além de um número enorme de compostos promissores ainda em testes pré-clínicos. Ressalta-se a existência de limitações importantes na translação da pesquisa pré-clínica para os testes em seres humanos. A dificuldade em se obter um suprimento adequado da substância, seja por síntese total, seja semi-síntese ou mesmo aquicultura, e a elevada toxicidade associada a muitas dessas substâncias são as principais causas de atraso nesse processo (COSTA-LOTUFO et al., 2009; STONIK, 2009). Nesse contexto, a pesquisa com microrganismos cultiváveis surge como resposta à crescente demanda de sustentabilidade e inovação na pesquisa e desenvolvimento de medicamentos a partir de produtos naturais.

A história do desenvolvimento do Yondelis<sup>®</sup> ilustra muito bem como um microrganismo pode contribuir com o processo de desenvolvimento do medicamento (CUEVAS & FRANCESH, 2009). Dada a complexidade da síntese da trabectedina, os esforços iniciais para obtenção da substância foram concentrados na aquicultura da ascídia, entretanto mesmo obtendo sucesso na aquicultura, o baixo rendimento da trabectedina (0.0001%) não permitia sua comercialização (CUEVAS & FRANCESH, 2009). Foi apenas com a descoberta de um processo de semisíntese a partir da cianosafracina B, obtida a partir da fermentação da bactéria *Pseudomonas fluorescens*, que a comercialização do Yondelis<sup>®</sup> pode ser viabilizada (IKEDA et al., 1983a; 1983b; CUEVAS et al., 2000a; 2000b; 2001).

De fato, desde a descoberta da penicilina por Alexander Fleming em 1929, os microrganismos são reconhecidos por sua capacidade metabólica (MURPHY, MALONEY e FENICAL, 2009). Cerca de 70.000 novas moléculas obtidas de origem microbiana foram descritas e são de grande importância para a descoberta de novos medicamentos. Apesar da maioria dos compostos de origem microbiana terem sido isolados de fontes terrestres, os microrganismos do ambiente marinho são considerados como fonte potencialmente produtiva de metabólitos secundários com diversas propriedades farmacológicas (BÉRDY, 2012; BÉRDY, 2005; LIU et al., 2008).

Estima-se que exista nos mares e oceanos um ambiente microbiológico complexo onde é possível encontrar  $10^6$  microrganismos por mililitro de água do mar e  $10^9$  microrganismos/cm<sup>3</sup> de sedimento marinho (FENICAL e JENSEN, 1993). Estes microrganismos que habitam o ambiente marinho são submetidos a altas salinidades, altas pressões, e a relações extremamente complexas com diferentes macrorganismos, muitas vezes em uma relação de simbiose a fim de obter alimentos (WARD e BORA, 2006). Devido a todas essas pressões impostas pelo ambiente marinho, os microrganismos que habitam este ambiente necessitam de um aparato metabólico mais aperfeiçoado. São, portanto, capazes de produzir metabólitos únicos ainda não descritos para o ambiente terrestre, tornando-se um excelente recurso para a descoberta de novas entidades químicas com potencial farmacológico (LIU et al., 2008).

Em contraste com macrorganismos que necessitam de grandes quantidades de material coletado para a obtenção do composto biologicamente ativo, os microrganismos apresentam a vantagem de uma produção viável e sustentável. A cultura em larga escala e a fermentação dos organismos de origem geram grandes quantidades de metabólitos secundários através de um custo razoável. (WAITES, et al., 2001). Fungos e bactérias destacam-se entre os grupos de microrganismos sendo esses dois grupos responsáveis pela produção de uma elevada taxa de antimicrobianos, mostrado em diversas triagens estudadas (KELLER e ZENGLER, 2004; PELAEZ e GENILLOUD, 2003; CAPON, 2001).

O grupo Bacteria apresenta 53 filos descritos até o momento, porém apenas uma pequena parcela deste grupo, formado por 5 subgrupos, são reconhecidos pela capacidade de produzir moléculas com potencial anti-infeccioso (VALAS et al., 2011; KELLER e ZENGLER, 2004). Dentre estes, a classe das actinobactérias é o grupo que mais se destaca. Os actinomicetos, membros da Ordem *Actinomycetales*, são responsáveis por 70% das moléculas bioativas produzidas por microrganismos com cerca de 7.000 compostos descritos no Dicionário de produtos naturais (JENSEN et al., 2005).

Os actinomicetos são bactérias filamentosas, gram-positivas de ciclo de vida complexo, integrantes do grupo das actinobactérias. Os actinomicetos formam um grupo filético distinto na árvore para os *clusters* gênicos 16S ADNr e 23S ADNr, tendo como característica marcante um ADN linear e com alta concentração de guanina (G)

+ citosina (C) (GOODFELLOW e FIEDLER, 2010; VENTURA, et al., 2007; STACKEBRANDT, RAINEY e WARD-RAINEY, 1991).

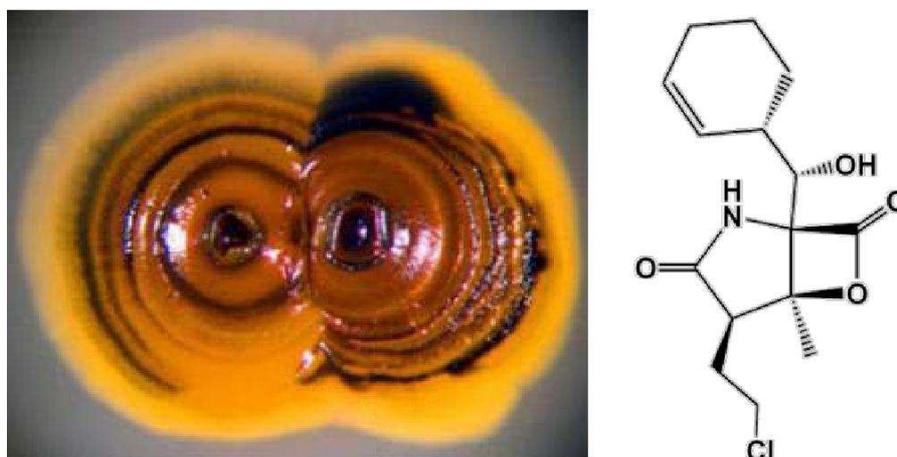
Entretanto este conceito tem sido modificado através de estudos recentes, uma vez que essa alta taxa de guanina e citosina do ADN genômico estão presentes principalmente nos actinomicetos de solo. Recentemente ao usar técnicas de metagenômica em actinomicetos isolados de água doce, observou-se baixas taxas de C+G no material genético dos organismos (GHAI, MCMAHON e RODRIGUEZ-VALERA, 2012).

Os actinomicetos estão amplamente distribuídos no ambiente terrestre, de água doce e no ambiente marinho, tendo o primeiro relato de isolamento para este último ambiente sido reportado há várias décadas atrás. Os actinomicetos apresentam uma ampla distribuição no ambiente marinho, tendo sido isolados tanto de organismos vivos como plantas e invertebrados, como de sedimentos. Estes organismos são de grande importância para o ecossistema marinho, por serem componentes ativos, pela capacidade de formar populações estáveis e constantes e por estarem envolvidos na renovação da matéria orgânica (JENSEN, et al., 2005; HEUER, et al., 1997; HANN, 2009; COLQUHOUN, et al., 1998; GOODFELLOW e WILLIAMS, 1983; CASTILLO, et al., 2005; SUN, et al., 2010).

O gênero *Salinispora* foi isolado por Jensen e colaboradores em 1991 na região das Bahamas, este por sua vez foi identificado como sendo uma espécie do gênero *Micromonospora* pertencente à família *Micromonosporaceae* através de ferramentas taxonômicas tradicionais (JENSEN et al., 1991). Posteriormente estudos de filogenia molecular realizados usando os dados da sequência do gene 16S rADN mostrou que a cepa isolada diferia de todas as espécies existentes do gênero *Micromonospora*, sendo então sugerido que este novo actinomiceto isolado constituía um novo gênero nomeado primeiramente como *Salinospora*, que veio a ser mudado para *Salinispora* (MINCER et al., 2002).

O gênero *Salinispora* foi o primeiro gênero obrigatoriamente marinho já isolado, este é representado por apenas três espécies descritas como *S. arenicola*, *S. pacifica* e *S. tropica* que são amplamente distribuídas nos sedimentos das regiões oceânicas tropicais e subtropicais apresentando abundância de  $10^4$  UFC/ml de sedimento (MINCER et al., 2002).

*S. tropica* é uma espécie estritamente marinha capaz de produzir o composto salinosporamida A (NPI-0052) (Figura 05), uma potente gama- $\beta$ -Lactona-Lactama citotóxica capaz de inibir a proliferação celular *in vitro* de células da linhagem de carcinoma de cólon humano HCT-116 com concentração inibitória média de 11 ng/mL, quando testadas em outras 60 diferentes linhagens de células tumorais o composto apresentou  $CI_{50}$  menor que 10 ng/mL obtendo melhores resultados contra as linhagens de carcinoma de pulmão de células não pequenas (NCI-H226), glioblastoma (SF-539), melanoma SK-MEL-28 e mama (MDA-MB-435) (FELING et al., 2003).



**Figura 05** - Estrutura química da Salinosporamida A, isolado da espécie marinha *S. tropica*.

A salinosporamida A (NPI-0052) (Figura 05) é um potente inibidor de proteosoma 20S, complexo enzimático multicatalítico responsável pela degradação de proteínas não-lisossomais das células. O composto é capaz de inibir a atividade da proteína em concentrações de 1,3 nM, concentração 35 vezes menor a apresentada pelo composto omuralida, utilizado como controle positivo (FELING *et al.*, 2003).

Após três anos da sua descoberta, em 2003, a salinosporamida A ingressou na fase I de testes clínicos para o tratamento de pacientes com mielomas múltiplos, linfomas, leucemias e tumores sólidos. O fármaco marizomibe, nome comercial da salinosporamida A, é produzido pela indústria Nereus Pharmaceuticals, Inc. através de um reforçado processo de fermentação salina do actinomiceto marinho *S. tropica* NPS21184 (SUBRAMANI e AALBERSBERG, 2012; MAYER et al., 2010).

A taxa de isolamento de novas moléculas a partir de actinomicetos tem diminuído enquanto que a taxa de redescobrimto dos compostos anteriormente isolado é estimada em 95% (FENICAL et al., 1999). Nas últimas duas décadas, as triagens foram intensificadas devido a técnicas de alto rendimento. Diferentes laboratórios acadêmicos e empresas se concentraram principalmente sobre o rastreio de grandes coleções de actinomicetos, isoladas de diferentes origens geográficas, para avaliar os padrões de produção de metabólitos secundários em condições alternativas. Com a inclusão das ferramentas de-replicação nas fases iniciais das telas de alto rendimento, o sucesso na detecção de novos compostos foi aumentado por exclusão de produtos naturais já conhecidos (NOVÁKOVÁ e FARKASOVSKÝ, 2013). Este dado reflete a problemática enfrentada pelos pesquisadores devido à capacidade limitada de cultivo das estirpes de actinomicetos isolados, pois se estima que os simbiontes e mais de 99% dos microrganismos não são capazes de ser cultivados através de técnicas tradicionais de cultivo em laboratório, limitando assim a descoberta de novas drogas (WARD, WELLER e BATESON, 1990; LI e VEDERAS, 2009).

O cultivo de microrganismos provenientes do ambiente marinho apresenta taxas inferiores as encontradas para o solo terrestre, que apresenta uma percentagem de 0,30%. O valor é considerado alto quando comparado aos valores de 0,25% e 0,001-0,10% relativos ao sedimento marinho e a água do mar respectivamente (AMANN, LUDWIG e SCHLEIFER, 1995; TORSVIK, GOKSOYR e DAAE, 1990).

As dificuldades encontradas para o cultivo de muitos microrganismos podem estar associadas as dificuldades de simular as condições ambientais as quais esses organismos vivem, pois estes estão sujeitos às várias adversidades impostas pelo ambiente marinho tais como pressões extremamente elevadas, diferentes profundidades, variações bruscas de temperatura, condições anaeróbicas e variações de pH (MANIVASAGAN, et al., 2013; BULL, et al., 2005; Magarvey, et al., 2004).

Outro fator importante que responde a essa baixa taxa de culturabilidade está relacionada à capacidade dos microrganismos viverem em simbiose com outros organismos, onde o hospedeiro fornece um ambiente rico em nutrientes e em contrapartida o microrganismo produz antimicrobianos para proteção do organismo

hospedeiro (PENESYAN, KJELLEBERG e EGAN, 2010; XIN, et al., 2008). É importante a compreensão da ecologia do organismo como também o conhecimento das relações existentes no processo de simbiose, como por exemplo, as relações químicas existentes no ambiente onde o organismo habita, a fim de fornecer um ambiente favorável ao crescimento dos microrganismos isolados (RHEIMS e STACKEBRANDT, 1999).

As técnicas moleculares possibilitam a superação das limitações da cultura dos microrganismos e podem ser utilizadas para investigar a ecologia das actinobactérias. Em virtude do insucesso de procedimentos baseados em cultura, que colocaram em evidência novas linhagens de actinobactérias, observou-se a utilização da técnica para detectar actinobactéria em amostras ambientais, sedimento e água. Em contraste, existem casos em que actinobactérias foram isoladas a partir de amostras ambientais, mas não foram detectados nas bibliotecas de clones geradas a partir da amostra coletada. Iniciadores específicos para Actinobactéria foram concebidos para aumentar a probabilidade de detectar actinobactéria 16S ADNr em ADN extraído de amostras de comunidade (STACH et al. 2003).

Sendo assim é extremamente difícil acessar a diversidade microbiana dos mares e oceanos, e fica clara a necessidade do uso de diferentes abordagens nos programas de prospecção de recursos marinhos com aplicação biotecnológica. No presente trabalho, realizamos um estudo pioneiro para o Arquipélago de São Pedro e São Paulo, ponto mais distante do litoral brasileiro, com o objetivo de realizar a prospecção de substâncias com potencial utilização no tratamento do câncer a partir de microrganismos cultiváveis recuperados do sedimento.

A costa brasileira é a segunda maior costa contínua no mundo com aproximadamente 8.500km de extensão, além de cinco conjuntos de ilhas oceânicas: Arquipélago de Fernando de Noronha (FN), Ilha de Trindade e Arquipélago Martim Vaz (TMV), Atol das Rocas (AR) e Arquipélago de São Pedro e São Paulo (ASPSP). Toda esta área abriga um potencial latente para descoberta de novos compostos de interesse médico e farmacológico.

O Arquipélago São Pedro e São Paulo (ASPSP) está localizado em um dos pontos mais remotos do oceano Atlântico. Situando-se a 1.100 km do estado do Rio Grande do Norte e a 522 km do Arquipélago de Fernando de Noronha. O arquipélago é composto por um grupo remoto de ilhotas, sendo um local de difícil acesso e ainda pouco explorado. A proximidade com a linha do Equador revela uma localização favorável à prospecção de novos agentes farmacologicamente ativos, visto que, de maneira geral os organismos que habitam as regiões tropicais exibem maior diversidade e concentração de metabólitos secundários quando comparados aos que vivem em baixas latitudes (VASKE-Jr. et al., 2010).

Desde 1996, o governo brasileiro tem administrado o Programa para o Arquipélago de São Pedro e de São Paulo (PRO-ARQUIPELAGO) com o objetivo de manter uma estação científica e projetos de pesquisa no ASPSP. As ilhas estão continuamente habitadas por cientistas que participam em expedições científicas ligadas a projetos previamente aprovados em diversas áreas de interesse, tais como geologia, geofísica, meteorologia, oceanografia, sismografia, recursos pesqueiros e biologia.

Vale ressaltar que a avaliação da atividade biológica pela citotoxicidade contra células do câncer foi devido que é uma doença-alvo que está pautada em dois pontos extremamente importantes: a epidemiologia da doença que corresponde a maior causa de mortes por doença no mundo (WHO, 2014) e ao fato de que é justamente no tratamento do câncer que os produtos naturais tem sua maior contribuição para o desenvolvimento de medicamentos, chegando a responder pela origem de mais de 70% dos compostos em uso clínico (Gullo *et al.*, 2006; Boopathy & Kathiresan, 2010; Kingston, 2011; Newman & Cragg, 2013).

Apesar do sucesso em diversas terapias e da quantidade de fármacos existentes para o tratamento das neoplasias malignas, a mortalidade associada ao câncer permanece inaceitavelmente alta, correspondendo a cerca de 8,2 milhões de mortes no ano de 2012, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) (INCA, 2014). Estima-se que 21,4 milhões de casos novos de câncer e 13,2 milhões de mortes por câncer ocorrerão até o ano de 2030. No Brasil, estima-se que em 2014, válido para o ano de 2015, haverá uma ocorrência de 576 mil casos novos de câncer, aproximadamente, sendo os cânceres de pele não melanoma, próstata e mama os mais incidentes (INCA, 2014).

Tradicionalmente, os estudos de novas drogas anticâncer a partir de produtos naturais fundamentam-se na identificação de atividade biológica em extratos orgânicos dos organismos. A partir daí, procede-se com o isolamento da molécula ativa, e por fim com o estudo aprofundado de sua atividade biológica. A sensibilidade dos métodos químicos atuais veio viabilizar o trabalho com quantidades cada vez menores de substâncias. São as chamadas técnicas hifenadas, ou combinações de cromatografia líquida de alta eficiência, ressonância nuclear magnética e espectrometria de massa, com uma alta capacidade de resolução, que permitem a detecção de compostos em quantidades ínfimas e precisão na determinação estrutural (Wagner-Döbler *et al.*, 2002). Os testes *in vitro* para avaliação da atividade biológica permitem a avaliação de um grande número de extratos, e a determinação da citotoxicidade *in vitro* tem se mostrado eficaz na descoberta de novos agentes antitumorais (Cragg & Newman, 2000; Newman *et al.*, 2003; Shoemaker, 2006).

Deste modo, o presente trabalho enfocou inicialmente a coleta de sedimentos no ASPSP. A partir das amostras coletadas foram realizadas duas abordagens: o isolamento do DNA metagenômico para uma análise preliminar da diversidade microbiana, bem como o isolamento dos microrganismos cultiváveis a partir de técnicas convencionais. A partir das colônias purificadas, obteve-se extratos orgânicos, que foram testados para a atividade citotóxica em células tumorais. Para aqueles extratos considerados ativos, foi realizado o fracionamento guiado pela atividade biológica para isolamento dos compostos bioativos.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo Geral**

Realizar um análise preliminar da riqueza e diversidade biológica microbiana assim como fazer a prospecção biotecnológica de metabólitos secundários produzidos por microrganismos recuperados dos sedimentos marinhos coletados no Arquipélago São Pedro e São Paulo.

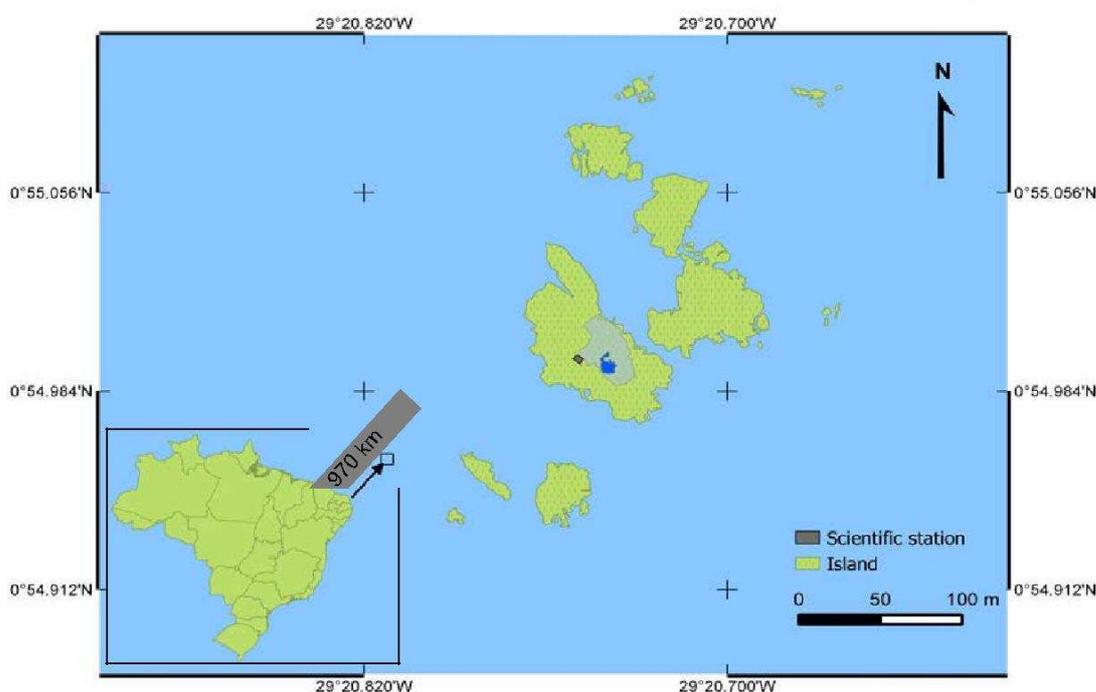
### **2.2. Objetivos específicos**

- Realizar uma análise preliminar quanto à riqueza e a diversidade biológica encontrada nos microrganismos recuperados do sedimento em torno do ASPSP.
- Isolar e cultivar a microbiota associada aos sedimentos circunjacente do ASPSP.
- Identificar taxonomicamente, a partir de uma abordagem molecular, as cepas microbianas recuperadas dos sedimentos localizados em torno do ASPSP e estabelecer relações filogenéticas entre as espécies encontradas.
- Realizar a prospecção biotecnológica de extratos orgânicos de culturas de bactérias obtidos das cepas isoladas a partir da avaliação da atividade citotóxica e reconhecimento da ocorrência de substâncias bioativas.
- Realizar o estudo químico do extrato orgânico de três cepas selecionadas a partir da avaliação da atividade citotóxica.

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Área de estudo

O ASPSP é formado por um conjunto de 15 ilhotas rochosas com aproximadamente 17.500 m<sup>2</sup> de área emersa, localiza-se próximo à linha do Equador, no hemisfério Norte sobre a Dorsal Meso-Atlântica (00° 56'N; 29°22'W). Esse arquipélago é considerado a região do Brasil que apresenta a maior proximidade com o continente africano. Dentre as ilhas que compõem o ASPSP, a ilha de Belmonte, considerada a maior entre elas, abriga a Estação Científica do Arquipélago São Pedro e São Paulo (ECASPSP) situada a 18 metros acima do nível do mar (Figura 05).



**Figura 06** - Mapa da localização geográfica do arquipélago São Pedro e São Paulo localizado no Oceano Atlântico equatorial, N00°55.1', W29°20.7', cerca de 970 km a ENE da cidade de Natal, capital do estado de Rio Grande do Norte (RN).

A estrutura rochosa do ASPSP apresenta uma composição geológica peculiar quando comparado às outras ilhas oceânicas, pois são comuns as rochas das ilhas oceânicas serem constituídas de origem vulcânica, entretanto as rochas encontradas no ASPSP são de origem plutônica, sendo uma das poucas áreas do mundo onde o manto abissal está exposto à superfície. Biologicamente, é parte das rotas de migração de uma variedade de peixes, e como este é um caso raro de formação da terra, o arquipélago tem uma biodiversidade rica e peculiar (VASKE-Jr. et al., 2010).

Estudos de diversidade microbiana no ASPSP são praticamente inexistentes e são restritos a estudos sobre a microbiota associada a invertebrados.

O ASPSP pode ser considerado um dos lugares mais inóspitos a vida humana existente no Brasil, pois é uma região de calor intenso, ventos de baixa velocidade e elevada distância da costa. Nota-se a ausência de água potável, abrigos naturais e também a ausência de regiões de praia para desembarque, além de está localizado em áreas de terremotos de média intensidade (VASKE-Jr. et al., 2010).

As altas pressões localizadas nas regiões subtropicais dos hemisférios atuam influenciando as condições climáticas do ASPSP, fazendo com que haja um intenso período chuvoso entre os meses de dezembro e abril e outro período com maior intensidade de ventos nos demais meses do ano. A temperatura e a salinidade verificadas nas águas do arquipélago apresentam-se estáveis ao longo do ano, com pequenas variações observadas na superfície (VASKE-Jr. et al., 2010).

### **3.2. Coleta do material**

As vinte e uma amostras de sedimentos usadas nesse estudo foram coletadas em duas expedições realizadas em fevereiro e novembro de 2011 nas regiões da Enseada e Cabeça de Tartaruga. Os sedimentos foram coletados em porções de 20 g, e armazenados em sacos estéreis de 7,5 x 18,5 cm (Whirl-Pak, Nasco) a 20°C para o transporte. O Prof. Dr. Tito Monteiro da Cruz Lotufo, do laboratório de Ecologia Animal, do Instituto de Ciências do Mar, da Universidade Federal do Ceará, realizou a coleta do material através de mergulho com SCUBA em três pontos do ASPSP, Boca da Enseada, Enseada e Cabeço de tartaruga, durante os dois semestres de 2011 (amostras E1 e E2, respectivamente).

### **3.3. Extração e purificação do ADN total**

#### **3.3.1. Extração do ADN**

Para a obtenção de um *pool* de sedimento, uma porção de cada amostra coletada foi separada e misturada em um frasco estéril, em seguida, 2,5 g desse *pool* foi levemente macerado em um almofariz com auxílio de um pistilo esterilizado. O sedimento macerado foi transferido para um tubo de fundo cônico e adicionado 6,75 mL da solução de tampão de extração (100 mM Tris HCl pH 8.0; 100mM EDTA pH 8.0; 100mM de fosfato de sódio pH 8.0; 1,5M de NaCl e 1% de CTAB) e 50µL de proteinase K (10 mg/mL).

A mistura obtida foi agitada horizontalmente a 225 rpm por 30min a 37 °C, logo após foi adicionado 0,75 mL de SDS 20% e incubado em banho maria a 65°C por 2 h, havendo leves agitações a cada 20 min. Após o período de incubação, a mistura foi centrifugada a 6000 g por 10min em temperatura ambiente. O sobrenadante obtido foi transferido para tubos de fundo cônico de 50 mL estéreis, o precipitado foi extraído por mais duas vezes com 2,25 mL do tampão de extração e 0,25 mL de SDS 20% sob agitação no vórtex por 10 segundos, seguido de incubação em banho maria e centrifugação como citado acima.

Aos sobrenadantes obtidos foi adicionado o mesmo volume de solução fenol-clorofórmio (1:1), misturados por leves inversões nos tubos e depois centrifugados a 20.000 g por 5 min, após a centrifugação a camada aquosa (superior) foi transferida, evitando a interface, para um novo tubo. Para retirada do excesso de fenol, um volume igual de clorofórmio foi adicionado a fase aquosa e centrifugado por 3 min a 20.000 g (ZHOU et al., 1996).

#### **3.3.2. Purificação do ADN total**

Um volume de 2,5 a 3 vezes de etanol P.A. foi adicionado à fase aquosa (superior) para a precipitação do ADN total extraído durante 10 min em banho de gelo, depois deste período, o tubo foi centrifugado e o sobrenadante descartado.

### 3.3.3. Amplificação do ADN total e Gel de eletroforese em gradiente

#### Desnaturante (DGGE)

As análises das comunidades de bactérias foram feitas através do perfil de bandas apresentados no gel de DGGE.

O ADN total extraído foi submetido primeiramente a uma reação de amplificação da região V3 do gene 16S ADNr utilizando os iniciadores 338F GC (5' GCC CGC CGC GCG CGG CGG GCG GGG CGG GGG CAC GGA CTC CTA CGG GAG GCA GCA 3') e 518R (5' ATT.ACC GCG GCT GCT GG 3'). A amplificação foi realizada em um termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf) nas seguintes condições: 95°C por 5 min, 30 ciclos de 92°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 1 min, e um período de extensão final a 72°C por 10 min.

Para a determinação da estrutura da comunidade de Archaea, foi feita prévia amplificação do gene 16S rADN com os iniciadores universais, 20F (5' TTC CGG TTG ATC CYG CCR G 3') e 958R (5' YCC GGC GTT GAM TCC AAT T 3'), nas condições de 95°C por 5 min, 30 ciclos de 95°C por 30 s, 53°C por 30 s e 72°C por 1 min; e uma extensão final de 72°C por 10 min.

Uma nova amplificação foi realizada com 1 µL dos produtos da amplificação anterior para servir de molde para uma nova amplificação utilizando os iniciadores específicos para a região V3 do 16S ADNr, 340F GC (5' CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC CTA CGG GGY GCA SCA 3') e 519R (5' TTA CCG CGG CKG CTG 3'), sob as seguintes condições: 95°C por 5 min e 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 53°C por 30 segundos, 72°C por 1 min e um período de extensão final a 72°C por 6 minutos.

Todas as reações foram feitas usando de 10 a 20 ng/µL de ADN total do sedimento, o que correspondia a um volume de 1 µL. Todas as reações foram de 25 µL e continham: 2,5 µL de tampão para PCR 5X; 10 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM; 1,0 µL de dNTP 10 mM; 0,2 µL de Taq Polimerase 5U (Invitrogen); 1 µL de cada iniciador a 5 pmol e água ultrapura (Milli-Q) esterilizada, completando o volume final. Os produtos gerados foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 2%, marcado com SYBR® Safe ADN (Invitrogen) em TBE 0,5X, utilizando-se um sistema de fotodocumentação ultravioleta (UVP).

Como padrão de tamanho de ADN, foi utilizado um marcador de massa molecular de ADN de 1Kb (Invitrogen). Os amplicons gerados foram separados por Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE). Os géis de acrilamida 8% foram preparados com gradientes desnaturantes de 30 a 65%, usando uma solução desnaturante 100% (7M uréia e 40% formamida) e uma solução 0% (sem ureia e formamida) (ØVREÅS et al., 1997). A eletroforese foi realizada a 60°C e a 200V constantes por 4h, em um sistema DCode (BioRad), utilizado a solução tampão TAE 0,5X (acetato de Tris 20 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). Após a eletroforese, o gel foi imerso em solução de SYBR-Green I (Molecular Probes) na concentração de 1:10.000 (v/v) por 1h. A imagem do gel foi capturada em um sistema de fotodocumentação ultravioleta (UVP).

#### **3.3.4. Análise dos dados**

Os géis de DGGE foram analisados utilizando a plataforma GelCompar II do *software* BioNumerics (Applied Maths, Bélgica) utilizada para normalização dos dados, conversão e a comparação das imagens em matrizes de presença/ausência e intensidade de bandas. A normalização e seleção de bandas, feita pelo programa, foram cuidadosamente avaliadas e corrigidas manualmente quando necessário. Com o auxílio do programa, foram gerados agrupamentos hierárquicos e matrizes considerando presença ou ausência das bandas, as quais foram utilizadas para análises subsequentes de índices de diversidade utilizando o programa primer 6.0.

Os Diagramas de Venn foram construídos para melhor visualização das Unidades Taxonomicas Operacionais (UTOs) exclusivas e compartilhadas entre as amostras, com o auxílio da ferramenta disponível no endereço de internet acessado (<http://www.pangloss.com/seidel/Protocols/venn.cgi>).

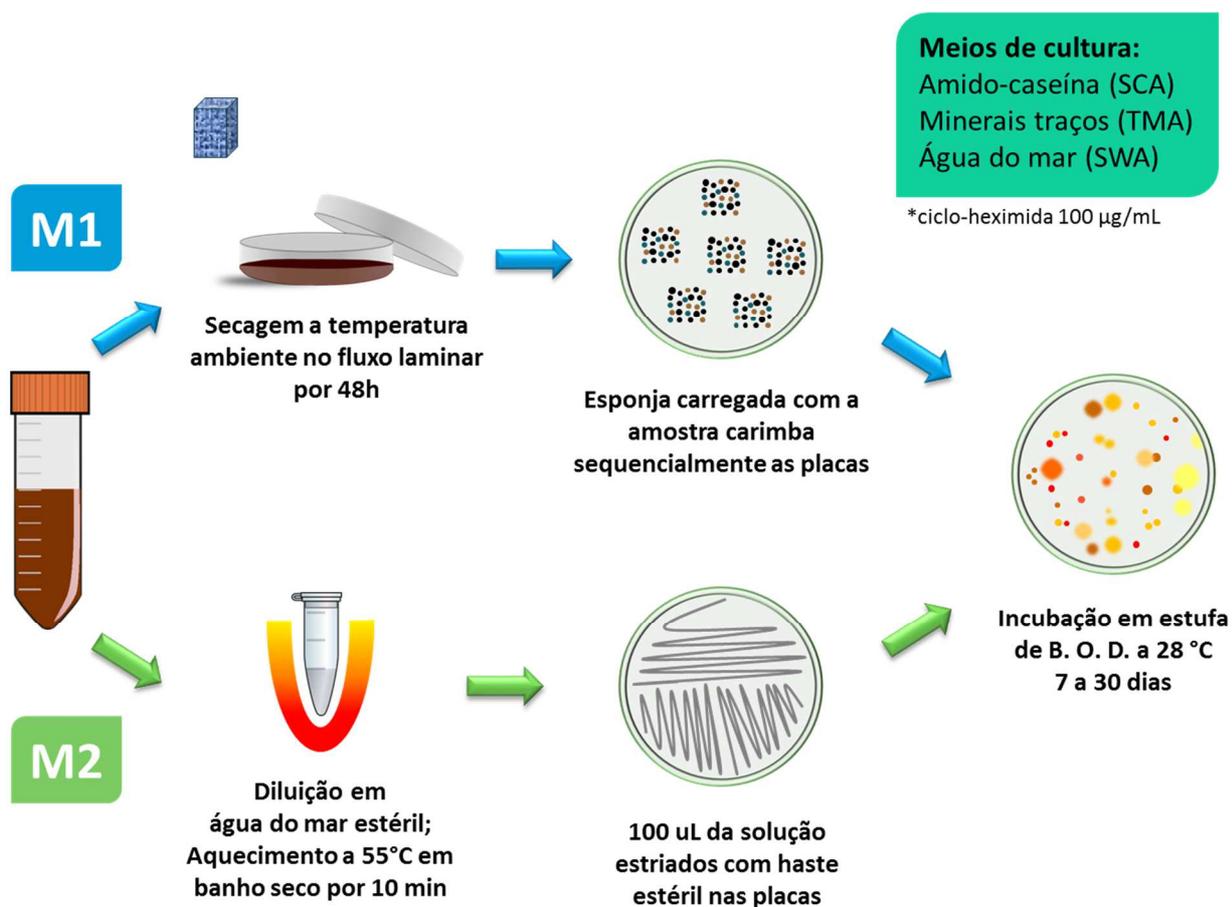
### 3.4. Processamento das amostras para isolamento dos microrganismos

#### cultiváveis

Todo o material coletado foi processado e plaqueado *in situ*, na Estação Científica do Arquipélago São Pedro e São Paulo (ECASPSP). Chegando ao Laboratório de Ecotoxicologia Marinha, as amostras dos sedimentos coletados foram mais uma vez processadas, dessa vez em fluxo laminar e submetidas a duas metodologias diferentes de plaqueamento. A Figura 07 ilustra os procedimentos utilizados.

Para a primeira metodologia (M1), uma porção do sedimento foi espalhado em placas de petri estéreis e em seguidas foram deixadas em fluxo laminar para a secagem. Após 24 horas, cada amostra de sedimento foi homogeneizada com uma espátula estéril e em seguida com auxílio de uma esponja estéril, o sedimento foi carimbado em placas de Petri contendo diferentes meios de cultura. A segunda metodologia (M2), trata-se da diluição de uma porção equivalente a 1g de cada sedimento coletado e adicionado a 1mL de água do mar estéril. A solução obtida de cada diluição foi aquecida a 55°C por 10 minutos e plaqueados com auxílio de uma alça estéril através da técnica de esgotamento por estrias em placa de Petri contendo diferentes meios de cultura. As placas, após processamento, foram estocadas em estufas microbiológicas (B.O.D) a 28°C por 90 dias.

Três meios de composições diferentes, adicionados de ágar, foram utilizados para o isolamento das cepas dos microrganismos. O meio de cultura com composição mais pobre utilizado foi o água do mar ágar (SWA), composto por 1,8% de ágar em 75% de água do mar. O meio de metais traços ágar (TMA), também um meio pobre, foi formulado utilizando 1,8% de ágar,  $K_2HPO_4$  (0,5 g/L),  $Na_2HPO_4$  (0,7 g/L),  $KNO_3$  (0,1 g/L),  $NaCl$  (0,3 g/L),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,1g/L)  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  (0,02g/L) e em 75% de água do mar, e adicionou uma solução contendo  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,2 g/L),  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,18 g/L),  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$  (0,02 g/L),  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  (0,09 g/L),  $CoSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,01 g/L),  $H_3BO_3$  (0,1g/L) e  $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$  (0,1 g/L). O terceiro meio de cultura utilizado é um meio rico, amido caseína ágar (SCA; HIMEDIA), composto por 1,5% de ágar, 1% de caseína, 10% de amido e 37% de água do mar e preparado com água destilada, seguindo as instruções do fabricante. Para todos o meios de cultura utilizados foi adicionado 0,1 mg/mL de ciclohexamida para inibir o crescimento de fungos (Ver Anexo II).



**Figura 07** - Métodos empregados no isolamento de bactérias dos sedimentos do Arquipélago de São Pedro e São Paulo.

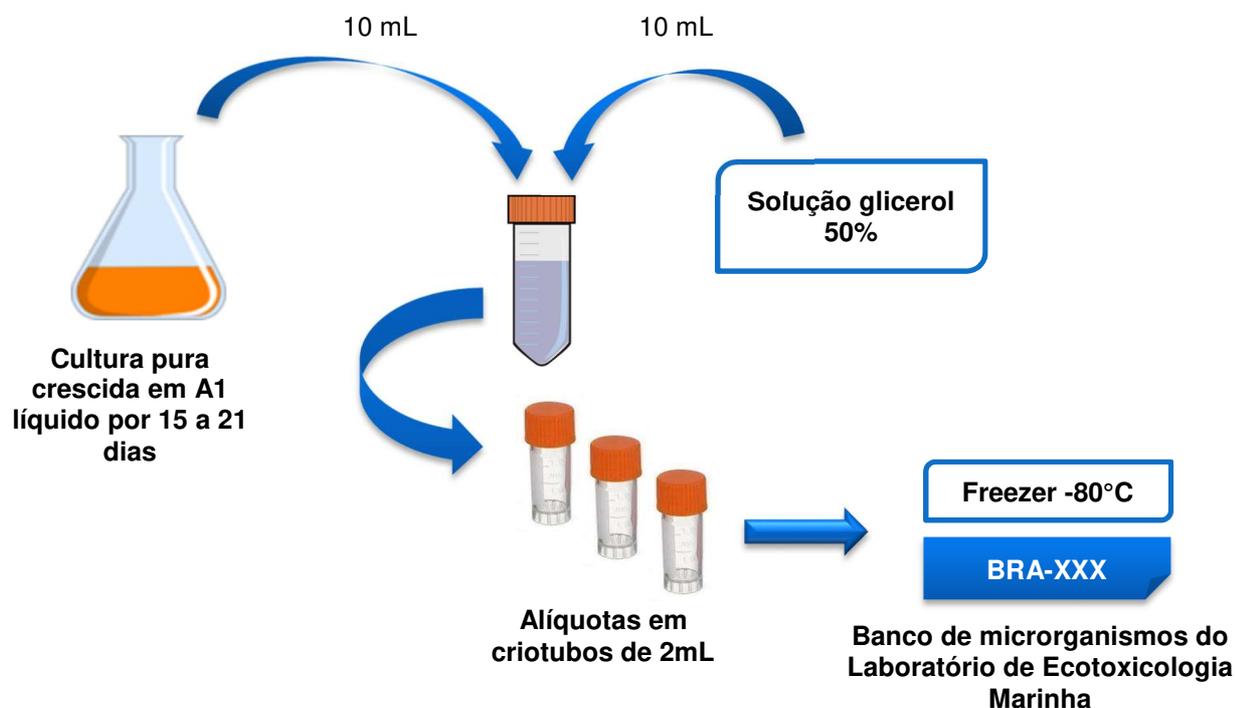
### 3.5. Isolamento dos microrganismos

As colônias foram selecionadas através de observações macroscópicas das placas de cultura e por suas características fenotípicas (cor, brilho, forma, textura, etc). As colônias foram recuperadas utilizando palitos de madeira estéreis, em seguida repicadas para uma nova placa de petri com meio de cultura sólido (A1) composto por água do mar 75% (v/v), 2% peptona, 10% de amido, 4% extrato de levedura e 1,8% de ágar.

### 3.6. Purificação, cultivo e criopreservação dos microrganismos

A purificação das linhagens de microrganismos foi realizada por meio de repiques sucessivos, pela técnica de esgotamento por estrias. Quando as cepas encontravam-se totalmente puras, as colônias foram inoculadas em meio de cultura líquido (A1) onde cresceram por 15 dias, sob agitação em agitadores orbitais com rotação de 200rpm e temperatura de  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Após este período, uma alíquota de 12,5 mL do caldo microbiano foi diluído a uma solução de glicerol 50% (v/v) na proporção de 1:1, homogeneizado, alíquotado em tubos criogênicos, congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  e catalogados no banco de microrganismos, os quais foram denominados de BRA, seguidas pela numeração ordenada no banco (Figura 08).

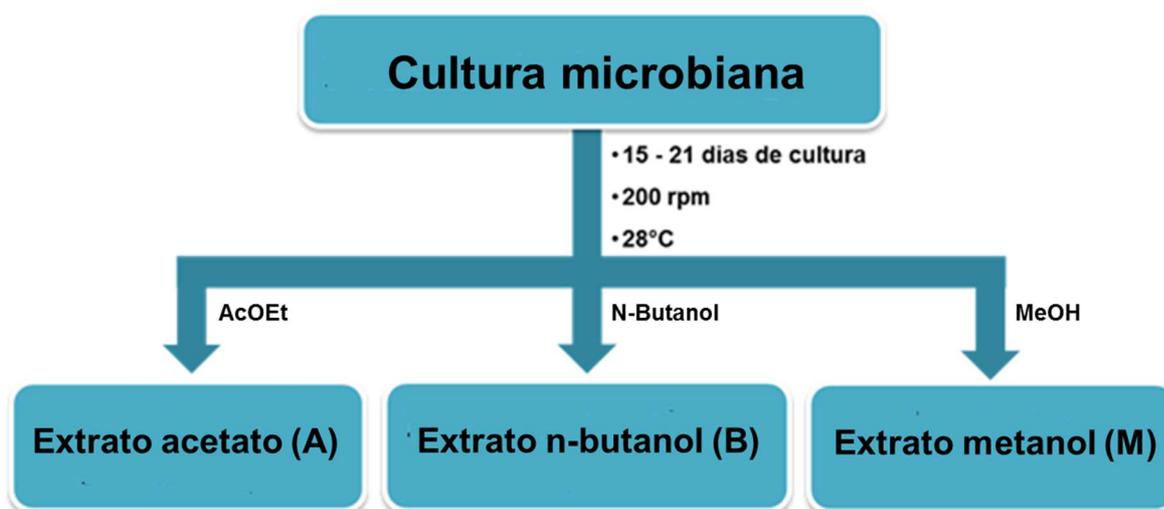


**Figura 08** - Método empregado na criopreservação das bactérias recuperadas do sedimento do Arquipélago de São Pedro e São Paulo.

### 3.7. Obtenção dos extratos

Para a obtenção dos fermentados biológicos, as culturas puras foram inoculadas em erlenmeyers de 500 mL contendo aproximadamente 100 mL de meio de cultura líquido (A1), e mantidos em agitação de 200 rpm à temperatura de  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante o período de 15 a 21 dias. O caldo da cultura resultante do crescimento de cada cepa foi dividido em porções iguais e cada porção foi extraída pelos solventes orgânicos: acetato de etila (AcOEt), n-butanol e metanol (MeOH).

As misturas com AcOEt e n-butanol foram mantidas em agitação de 100 rpm por uma hora em temperatura de  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ , após este período as porções foram submetidas a um processo de separação líquido-líquido em funil de separação. Para a extração com metanol, a amostra foi inicialmente liofilizada e, em seguida, submetida à extração com metanol (30 mL). Após esses processos, os extratos líquidos obtidos foram concentrados em evaporadores rotativos, para a obtenção do extrato bruto (Figura 09).



**Figura 09** - Fluxograma com a obtenção dos extratos orgânicos obtidos do fermentado biológico das cepas de bactérias recuperados do sedimento coletado no arquipélago São Pedro e São Paulo.

### 3.8. Caracterização química dos extratos ativos

Para a caracterização química inicial dos extratos utilizou-se um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a um espectrômetro de massas (CL-EM). O sistema CL-EM consistiu de um sistema CLAE acoplado com o espectrômetro de massa tipo IT-TOF (Shimadzu, Japão) equipado com fonte de ionização por "electrospray" (ESI) funcionando no modo positivo e negativo. Os espectros foram registados na gama de  $m/z$  100-1000 Da, utilizando um potencial de 4,0 kV no capilar, de  $\text{N}_2$  como gás de dessolvatação e He como gás de colisão.

Os espectros MS/MS foram realizados selecionando o íon precursor,  $[M + H]^+$ , utilizando uma energia de colisão de 125 mVolts. O sistema foi controlado pelo software *LC-solution*, o que também foi utilizado para a análise de dados. Uma alíquota (5  $\mu\text{L}$ ) de cada amostra na concentração de 1 mg/mL foi injetada em coluna

de fase reversa (C18, 150 x 2,0 mm, Shimadzu), que foi mantida a 35°C. As fases móveis consistiram de gradiente binário linear de CH<sub>3</sub>CN e H<sub>2</sub>O, a uma taxa de fluxo de 0,2 ml/min: 5 a 95 % CH<sub>3</sub>CN durante 30 minutos. No final desta sequência a coluna foi equilibrada sob as condições iniciais durante 10 min. O efluente da coluna foi diretamente transferido para a interface de ESI. A análise dos dados de massa obtidos através do sistema CL-EM foi submetido a uma pesquisa na base de dados *AntiMarin*, onde foi feita uma comparação das massas exatas de cada composto presente no cromatograma do LC/MS dos extratos ativos.

### 3.9. Crescimento em larga escala das cepas selecionadas

O crescimento em larga escala das estirpes BRA-132, BRA-199 e BRA-177 foi realizado em frascos de Erlenmeyer de 2L, onde uma alíquota de 50mL da cultura foi adicionada a um volume de 0,5L de meio A1 suplementado com carbonato de cálcio a 0,1% para promover o tamponamento do pH da cultura e 5g/L das soluções de sulfato de ferro (III) (Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>) e brometo de potássio (KBr) para complementar os sais da água do mar. As cepas BRA-132, BRA-199 e BRA-177 foram crescidas em 10L de meio de cultura suplementados (A1), as cepas BRA-132 e BRA-177 foram cultivadas durante um período de 15 dias, enquanto que o período de cultivo da BRA-199 foi de 5 dias. Todas as cepas foram crescidas em temperaturas de 28 °C e sob agitação de 150 rpm. Após esse período o caldo microbiano foi extraído com AcOEt sob agitação de 100rpm por 1 hora. Em seguida, foi submetido a uma separação líquido-líquido em funil de decantação para obtenção do extrato. O extrato obtido foi evaporado sob pressão reduzida para remoção do solvente e em seguida os extratos secos de BRA-132, BRA-199 e BRA-177 foram pesados e cada extrato apresentou um rendimento de 675 mg, 170 mg e 214 mg de extrato bruto, respectivamente.

### 3.10. Fracionamento bioguiado

Esta etapa do trabalho foi realizada no Laboratório de Plantas Medicinais do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará com auxílio da Dr<sup>a</sup>. Maria da Conceição Menezes Torres, sob a supervisão da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Otília Deusdênia Loiola Pessoa.

### 3.10.1. Fracionamento químico do extrato AcOEt da cepa BRA-132

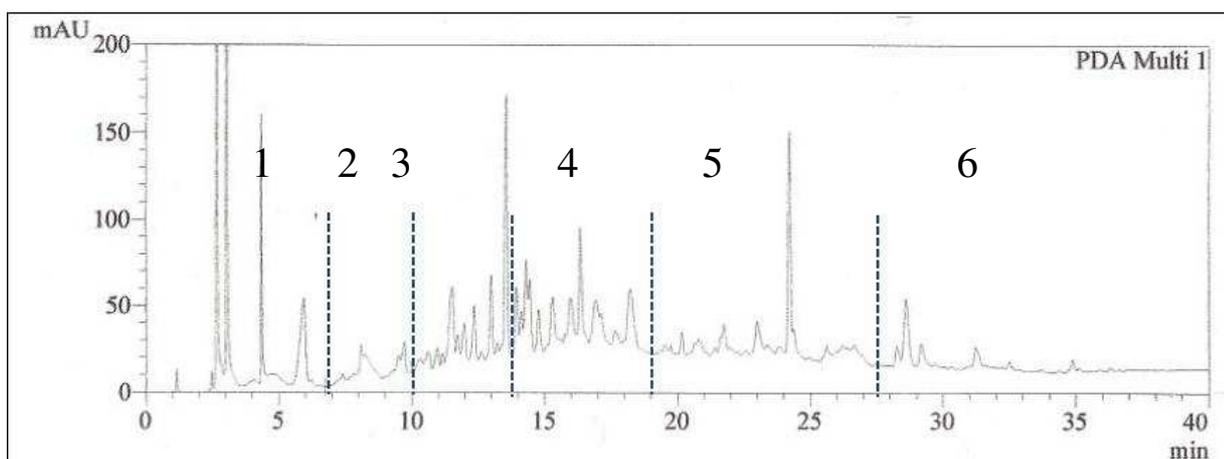
O extrato bruto (675 mg) obtido do caldo de cultura da cepa BRA-132 foi submetido a um fracionamento cromatográfico em coluna a vácuo utilizando como fase estacionária sílica gel e os solvente n-hexano (hex), AcOEt, MeOH e H<sub>2</sub>O, puros ou em mistura binária (hex/AcOEt 3:1; hex/AcOEt 2:1; hex/AcOEt 1:1; AcOEt/MeOH 4:1; AcOEt/MeOH 2:1; MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1) com ordem crescente de polaridade como eluente. A partir deste fracionamento, dez frações foram obtidas (Tabela 2).

**Tabela 2** - Fracionamento do extrato bruto da cepa BRA-132A obtido do crescimento em larga escala (10L).

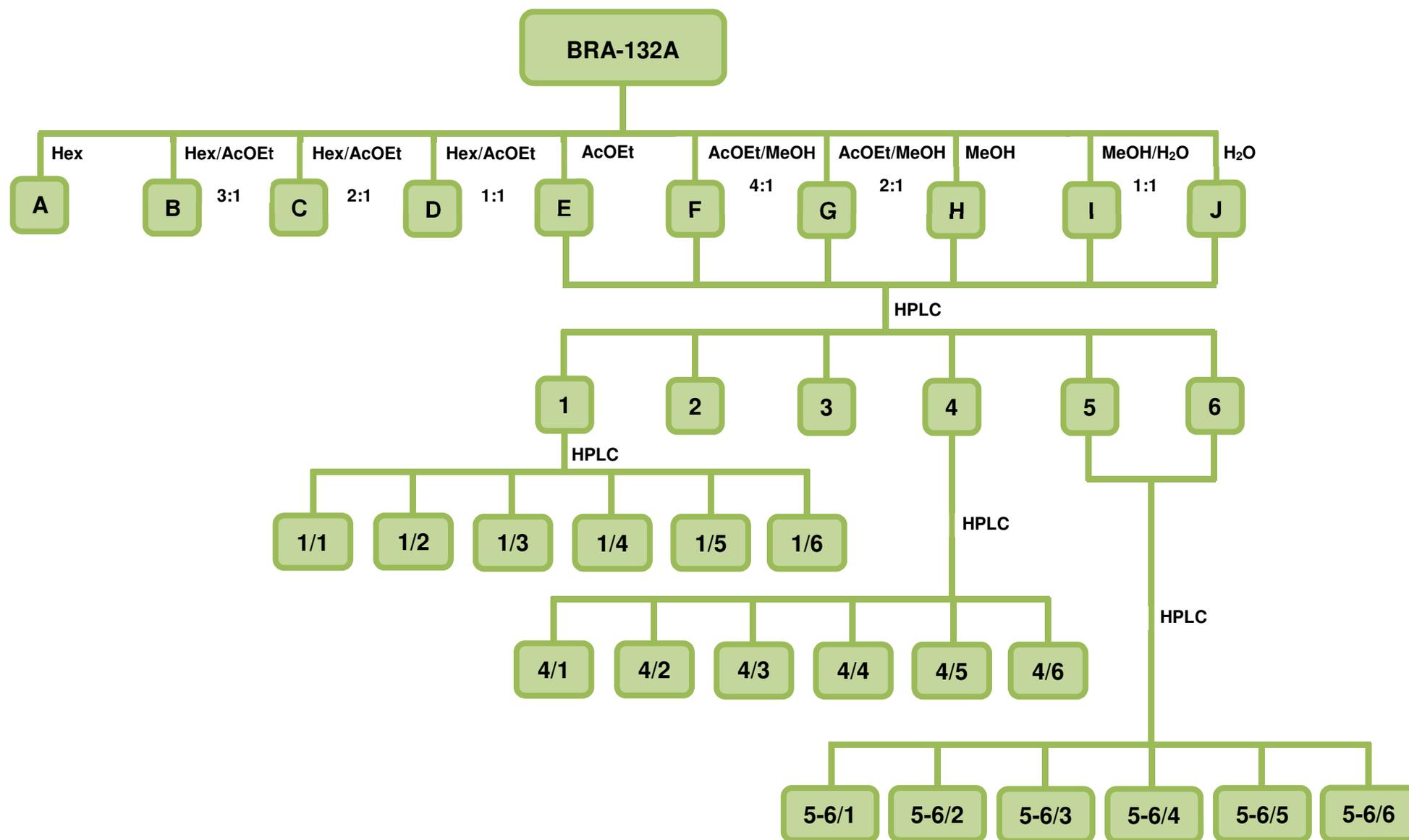
Eluente	Fração	Massa (mg)
Hexano	BRA-132A	2,0
Hexano/AcOEt 3:1	BRA-132B	3,6
Hexano/AcOEt 2:1	BRA-132C	1,5
Hexano/AcOEt 1:1	BRA-132D	2,5
AcOEt	BRA-132E	2,6
AcOEt/MeOH 4:1	BRA-132F	14,6
AcOEt/MeOH 2:1	BRA-132G	4,2
MeOH	BRA-132H	2,6
MeOH/H <sub>2</sub> O 1:1	BRA-132I	1,7
H <sub>2</sub> O	BRA-132J	4,6

A análise por LC/MS das frações A até J mostrou que as frações de E até J possuíam perfil químico semelhante e, conseqüentemente, essas frações foram reunidas e submetidas a uma nova análise por HPLC em coluna de fase reversa (C-18; 5 µm; 4,6 x 250 mm). Um gradiente binário composto de acetonitrila (CH<sub>3</sub>CN)/H<sub>2</sub>O foi utilizado como eluente, variando a concentração de CH<sub>3</sub>CN de 5-95% em 30 min., seguido de lavagem da coluna com o CH<sub>3</sub>CN 100% por 10 min. Este procedimento forneceu seis subfrações, as quais foram coletadas e concentradas (Figura 10).

As subfrações BRA132(E-J)/5 e BRA132(E-J)/6 foram reunidas por apresentar perfil cromatográfico semelhante, gerando então a subfração BRA-132E-J(5-6), esta fração e as subfrações BRA132(E-J)/1 e BRA132(E-J)/4 foram submetidas separadamente a uma nova análise por HPLC sob as mesmas condições citadas anteriormente e fracionadas gerando seis novas subfrações. As subfrações obtidas foram submetidas, logo em seguida, a uma cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa a fim de detectar os compostos presentes e isolar o princípio ativo das subfrações (Figura 10).



**Figura 10** - Cromatograma representativo da obtenção das subfrações obtidas da fração BRA-132(E-J) através de HPLC.



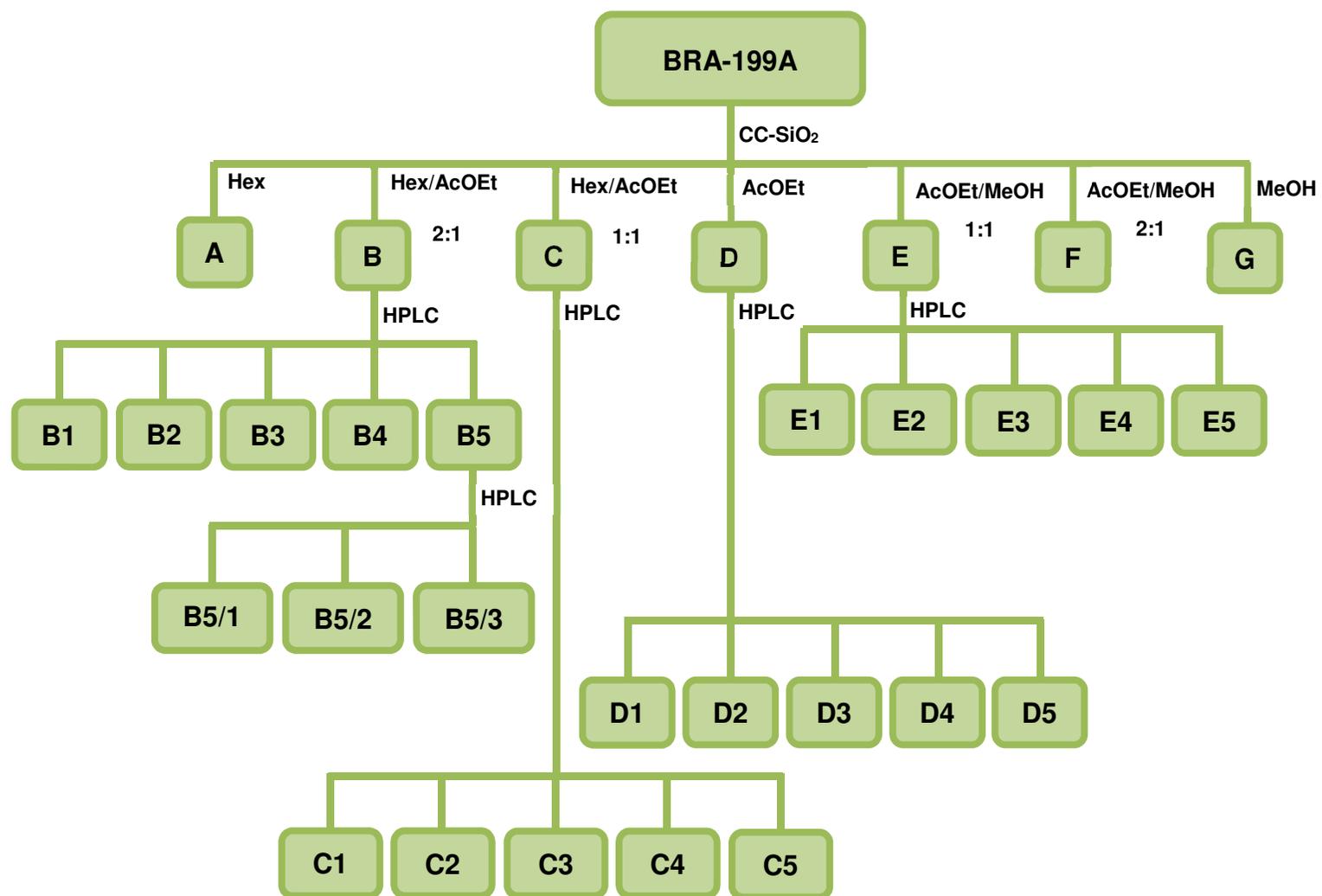
**Figura 11** - Fluxograma referente ao fracionamento químico do extrato bruto obtido do caldo microbiano da cepa BRA-132.

### 3.10.2. Fracionamento químico da cepa BRA-199

O extrato ativo da cepa BRA-199 (170,0 mg) foi fracionado em coluna de sílica gel empregando como eluentes os solventes puros n-hexano, EtOAc e MeOH, e mistura binárias com ordem crescente de polaridade, que gerou 07 frações (A, B, C, D, E, F, G) (Tabela 3; Figura 12). As frações B, C, D e E foram então submetidas a análise em HPLC em coluna de fase reversa (C-18; 5 µm; 4,6 x 250 mm). Um gradiente binário composto de acetonitrila (CH<sub>3</sub>CN)/H<sub>2</sub>O foi utilizado como eluente, variando a concentração de CH<sub>3</sub>CN de 5-95% em 30 min., seguido de lavagem da coluna como CH<sub>3</sub>CN 100% por 10 min. Para cada fração analisada, 05 novas subfrações foram obtidas e posteriormente foram testadas quanto ao potencial citotóxico (Figura 12).

**Tabela 3** - Fracionamento do extrato bruto da cepa BRA-199 obtido do crescimento em larga escala (10L).

<b>Eluente</b>	<b>Fração</b>
<b>Hexano</b>	BRA-199A
<b>Hex/AcOet 2:1</b>	BRA-199B
<b>Hex/AcOet 1:1</b>	BRA-199C
<b>AcOEt</b>	BRA-199D
<b>AcOEt/MeOH 1:1</b>	BRA-199E
<b>AcOEt/MeOH 2:1</b>	BRA-199F
<b>MeOH</b>	BRA-199G



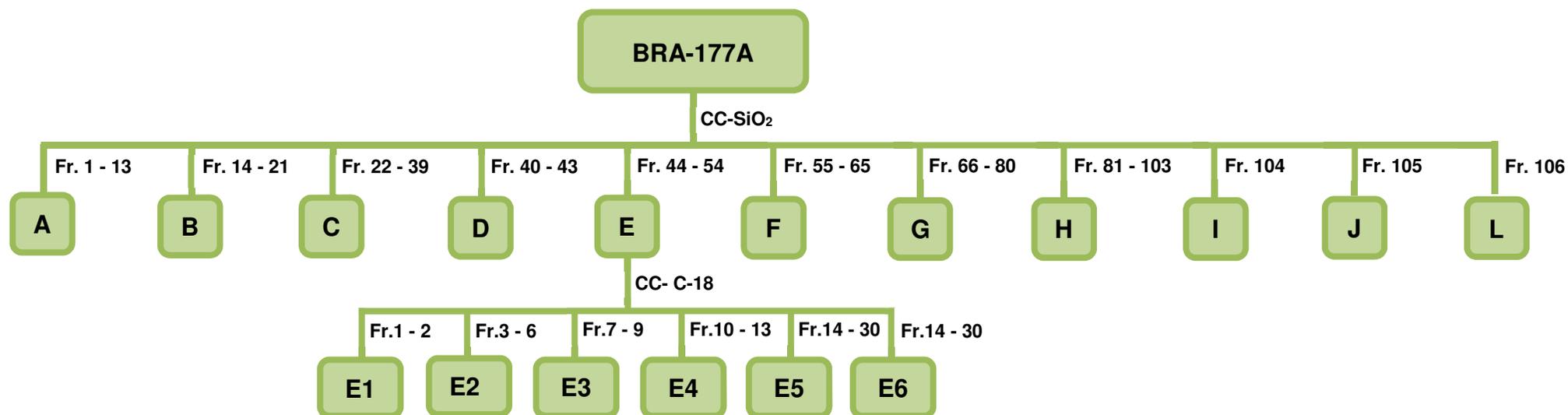
**Figura 12** - Fluxograma do fracionamento químico do extrato orgânico obtido da fermentação biológica em larga escala da cepa BRA-199.

### 3.10.3. Fracionamento bioguiado da cepa BRA-177

O extrato bruto (BRA-177EB) do crescimento em larga escala da cepa BRA-177 (214,0 mg) foi submetido à cromatografia de adsorção em SiO<sub>2</sub> usando como eluente os solventes Hexano, AcOEt, diclorometano (DCM) e MeOH, puros ou em misturas em ordem crescentes de polaridade, resultando em 107 frações com aproximadamente 5 mL cada. As frações resultantes foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD) e agrupadas em 12 frações (A a M) (Tabela 4, Figura 13). A fração BRA177A2E foi purificada em coluna de fase reversa (C-18) usando como fase móvel MeOH/H<sub>2</sub>O (9:10) seguido com MeOH. Foram coletadas 31 frações com aproximadamente 1 mL, que foram reunidas após análise por CCD em 6 frações (Tabela 5).

**Tabela 4** - Fracionamento do extrato bruto da cepa BRA-177 obtido do crescimento em larga escala (10L).

Frações	Sigla	Massa (mg)
1-13	BRA177A	36,1
14-21	BRA177B	2,0
22-39	BRA177C	5,3
40-43	BRA177D	1,9
44-54	BRA177E	11,8
55-65	BRA177F	10,4
66-80	BRA177G	5,9
81-103	BRA177H	5,9
104	BRA177I	9,3
105	BRA177J	42,0
106	BRA177L	29,2



**Figura 13** - Fluxograma do fracionamento químico do extrato acetato de etila obtido da cepa BRA-177.

**Tabela 5** - Fracionamento da fração BRA-177E por coluna cromatografiada C-18.

Frações	Sigla	Massa (mg)
1-2	BRA177E1	1,4
3-6	BRA177E2	0,6
7-9	BRA177E3	1,6
10-13	BRA177E4	
14-30	BRA177E5	4,5
31	BRA177E6	1,1

### 3.11. Determinação da atividade citotóxica

#### 3.11.1. Ensaio do MTT

Os extratos, frações e as substâncias puras foram investigados quanto a sua atividade antiproliferativa nas linhagens de células tumorais através do ensaio colorimétrico do MTT.

O método do MTT é quantitativo, indireto, rápido e sensível. Ele analisa a viabilidade com base no estado metabólico da célula, através da conversão do sal amarelo 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazólio (MTT) em um precipitado de coloração roxa (formazan), a partir da enzima succinil desidrogenase das mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas (MOSMANN, 1983).

Para o ensaio da atividade citotóxica, foram utilizadas as linhagens de célula tumoral humana de adenocarcinoma de cólon (HCT-116), carcinoma de ovário (OVCAR-8) e glioblastoma (SF-295). As células aderidas foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (Corning, 25 cm<sup>2</sup>, volume de 50 mL utilizando o meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (100UI penicilina/ 100 µg/mL estreptomicina), em estufa a 37°C com atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> e 95 % de umidade, seguido da observação do crescimento celular com ajuda de microscópio de inversão a cada 24 h. Quando necessário às células foram repicadas em novo meio de cultura.

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços nas concentrações de 0,5x10<sup>5</sup> céls/mL para HCT-116 e 0,1x10<sup>6</sup> céls/mL para OVCAR-8 e SF-295, em seguida foram incubadas durante o período de 72 horas com os extratos, frações ou substâncias puras previamente diluídos a uma concentração estoque de 10 mg/mL.

As amostras previamente diluídas em DMSO em uma concentração estoque de 10 mg/mL, foram inicialmente testadas de forma qualitativa em doses únicas de 5, 25 e 50 µg/mL a fim de selecionar as amostras potencialmente ativas, e aquelas que apresentassem inibição maior ou igual 75% do crescimento celular seriam testadas novamente em diluições seriadas variando entre (0,003 - 50 µg/mL) para extratos e (0,0016 - 25 µg/mL) para frações e compostos isolados para se obter a CI<sub>50</sub> da amostra. O quimioterápico doxorubicina foi usado na concentração de 0,3 µg/mL como controle positivo.

Após um período de incubação de 69 h, as placas foram retiradas, o sobrenadante foi aspirado e imediatamente foram adicionados 200 µL de solução de MTT 10 % em RPMI 1640, sendo a placa colocada novamente na estufa a 5 % de CO<sub>2</sub> por 3 h. Em seguida, o sobrenadante foi aspirado e seu precipitado ressuspendido em 150 µL de DMSO e agitado por cerca de 10 min, até completa dissolução dos cristais de formazan. As placas foram lidas no espectrofotômetro de placas em um comprimento de onda de 595 nm.

### **3.11.2. Análise estatística**

Os percentuais médios de inibição do crescimento (IC%), o desvio padrão médio (SEM), assim como a CI<sub>50</sub> (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (IC95%) foram calculados a partir de regressão não linear utilizando o programa Prisma versão 3.0 (GraphPad Software).

## **3.12. Identificação molecular**

### **3.12.1. Extração do ADN genômico**

ADN genômico foi extraído a partir da cultura pura das cepas selecionadas utilizando a metodologia com as adaptações de Garcia et al. (2013). Uma alíquota da cultura bacteriana fresca com crescimento de 3-5 dias, foi centrifugada (1500 rpm/3 min) para remover o excesso de meio de cultura, em seguida, foi adicionada a 1 mL de tampão de lise (2 % (m / v) de CTAB (Sigma Aldrich), 1,4 M de NaCl, 20 mM de EDTA, 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), a proteinase K adicionada de fresco 5 µg/mL (Invitrogen) e 0,5 % (v/v) de 2-mercaptoetanol (Sigma Aldrich).

A amostra foi congelada a -80 ° C por 3-5 min e logo depois foi descongelado em banho seco por 3 min a 65 ° C; ambos os passos foram repetidos duas vezes. Após este passo, um volume igual da solução foi adicionado fenol, clorofórmio e álcool isoamílico (25:24:1) e em seguida as amostras foram homogeneizadas por inversão. As amostras foram centrifugadas (7 min, 10000 rpm, 4°C), e a fase aquosa foi recuperada e misturado com 400 µl de clorofórmio e centrifugado (5 min, 10000 rpm, 4°C).

O ADN genômico foi precipitado pela adição de 0.75X vol. de acetato de amônio e 1 vol. de álcool isopropílico gelado, seguido de centrifugação (30 min, 12000 rpm, 4°C). Em seguida o sobrenadante foi descartado e o *pelet* formado foi lavado com etanol gelado (70%), depois centrifugado (10 min, 12000 rpm, 4°C) e enfim solubilizado em 35-50 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl e 1 mM de EDTA) e resfriados *overnight*. O ADN genômico foi quantificado em espectrofotômetro (*Nano Drop*). Para a confirmação da extração de ADN e de sua pureza, as amostras foram corridas em gel de agarose 1%, coradas com brometo de etídeo e visualizadas em transluminador.

### 3.12.2. PCR do ADN genômico

Para o sequenciamento das bactérias foi utilizado o produto da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), obtido a partir da reação com os iniciadores universais F27 (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e R1492 (5'- ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') (Heuer et al., 1997). A reação de amplificação do gene de RNAr 16S foi realizada em um volume total de 25 µl contendo 12,5 µl do mix de PCR (Tampão; DNTPs; MgCl<sub>2</sub>; Taq polimerase), 0,1 nM de cada iniciador e 100-150 ng de ADN. A PCR foi realizada utilizando um protocolo que tem 35 ciclos de partida com um período de desnaturação inicial a 94° C durante 12'30", seguido de uma desnaturação a 94°C durante 60s, uma fase de anelamento com temperatura de 63°C durante 60s e extensão em 72°C por 60s, onde o último ciclo é realizado pela uma extensão em 72° C. Os produtos de PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1% corados com *SYBR* e *Blue Juice*. Os produtos de PCR foram purificados utilizando o *EXO/SAP* seguindo as instruções do fabricante.

O sequenciamento do gene RNAr 16S foi realizado pela empresa Macrogen Inc. (Seoul, Coreia) com o kit de sequenciamento do ciclo ABI PRISM BigDye™ Terminator (Applied Biosystems, EUA) e os mesmos iniciadores utilizados para a amplificação, seguindo os protocolos fornecidos pelo fabricante.

As sequências forward e reverse obtidas foram alinhadas e as sequências consenso foram obtidas com a utilização do software Geneious 7 (Biomatters Ltd.). A sequência foi executada contra o EzTazon-e Banco de Dados (<http://www.ezbiocloud.net>) e as 25 sequências mais semelhantes foram obtidas para uma análise filogenética.

As sequências foram alinhadas com todos MAFFT versão 7 (KATOY e STANDLEY, 2013) e o modelo de substituição de nucleótidos foi selecionado com a utilização de jmodeltest2 (DARRIBA et al., 2012). As relações filogenéticas foram inferidas através de uma abordagem de máxima verossimilhança usando RaxML (STAMATAKIS, 2006) com 1000 replicações de *bootstrap*.

### **3.12.3. Análise dos dados e Identificação Molecular**

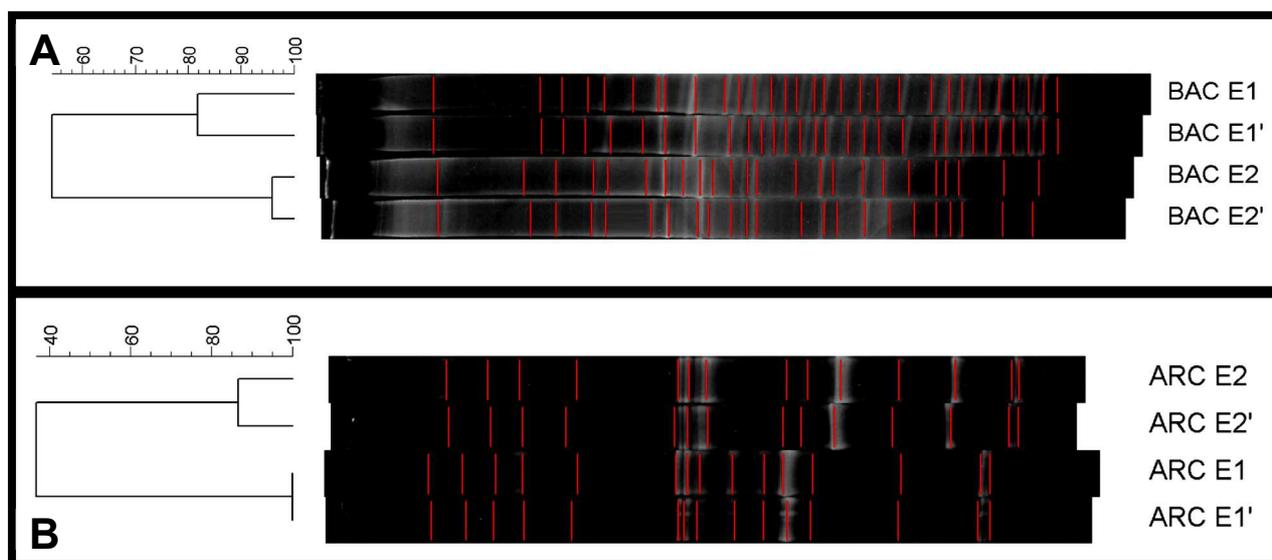
Uma vez obtidas as sequências de ADN, estas foram comparadas em banco genético utilizando-se o programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). A busca no BLAST alinha as sequências de RNAr 16S obtidas numa base de dados de sequências conhecidas a fim de encontrar o pareamento taxonômico mais aproximado (Altschul et al. 1997). Este programa encontra-se disponível na página do Centro Nacional para Informações em Biotecnologia dos Estados Unidos (National Center for Biotechnology Information), através do portal cujo endereço eletrônico é: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

## 4. Resultados

### 4.1. Estudos baseados em perfis de RNAr 16S

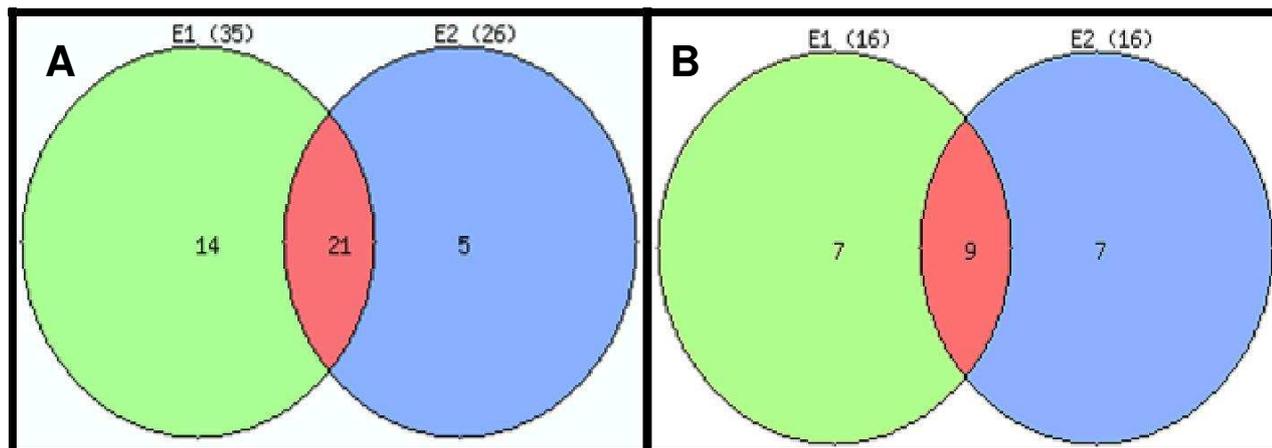
#### 4.1.1. Perfil da comunidade microbiana obtida através dos dados de DGGE

As comunidades de *Bacteria* e *Archaea* do *pool* de sedimentos coletados nos 1º(E1) e 2º semestres (E2) do ASPSP foram analisadas pelo perfil de bandas apresentado por DGGE. Através desta análise é possível observar diferenças entre as comunidades de bactérias e arqueias entre os diferentes períodos de coleta (Figura 14).



**Figura 14** - Perfil das comunidades de *Bacteria* (A) e *Archaea* (B) obtidos a partir do perfil de bandas do gel de DGGE do *pool* de sedimentos coletados em diferentes períodos.

Através dos dados de presença e ausência obtidos na análise do padrão de bandas do gel de DGGE pode-se estimar a riqueza de unidades taxonômicas operacionais (UTOs) presentes nos diferentes períodos e o compartilhamento das mesmas entre os períodos. Os dados obtidos mostram que o período E1 apresenta 14 UTOs exclusivas, tendo uma maior riqueza de sua comunidade bacteriana. O período E2 possui apenas 5 UTOs exclusivas, entretanto ambos os períodos compartilham a maioria de suas UTOs. A comunidade de *Archaea* dos períodos estudados apresentou-se similar para o número de UTOs exclusivas em ambos os períodos, compartilhando entre eles 9 UTOs (Figura 15).

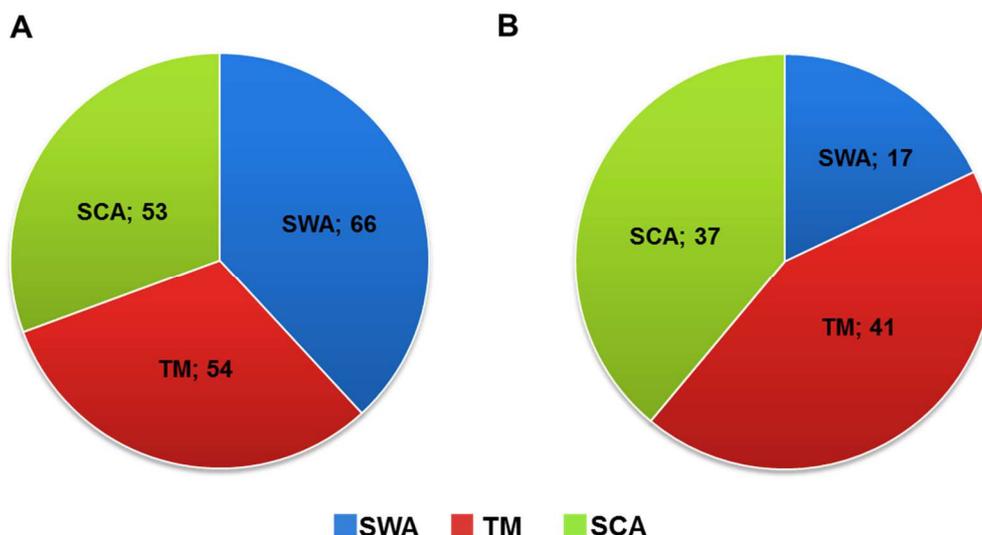


**Figura 15** - Diagramas de Venn representando a riqueza de UTOs das comunidades de Bacteria e Archaea entre os diferentes períodos de coleta (A) *Bacteria*.e (B) *Archaea*

#### 4.2. Isolamento e purificação dos microrganismos

Foram recuperadas das 21 amostras de sedimentos coletadas no ASPSP um total de 268 cepas de microrganismos através da aplicação dos dois diferentes métodos (carimbo/dessecação e diluição/aquecimento) para os três diferentes meios de composição nutricional adicionados de 0,1 mg/mL de ciclohexamida, utilizados no trabalho (SWA; TM e SCA).

Quando comparados os dois métodos utilizados no processamento das amostras de sedimentos, observou-se que mais da metade dos isolados foi proveniente do método do carimbo (M1) com 173 cepas isoladas e distribuídas igualmente entre os meios SWA, TMA e SCA, sendo assim o método mais eficiente para a obtenção de microrganismos se comparado a metodologia de diluição (M2), cujo plaqueamento rendeu 95 isolados, sendo estes recuperados principalmente dos meios SCA e TMA (Figura 16).

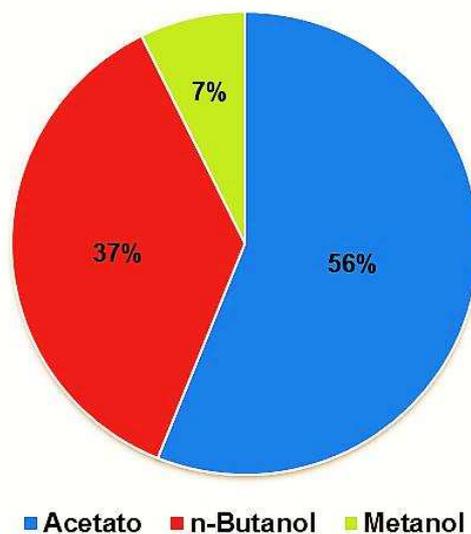


**Figura 16** - Gráfico em pizza ilustrando o número de colônias isoladas utilizando as metodologias do carimbo (M1) (A) e diluição (M2) (B) para os três diferentes meios de cultura aplicados.

### 4.3. Avaliação da citotoxicidade dos extratos brutos

Das 268 cepas isoladas, 94 estirpes foram eleitas aleatoriamente para um crescimento em pequena escala e obtenção dos extratos orgânicos, que em uma análise qualitativa preliminar para a atividade citotóxica contra linhagem de adenocarcinoma de cólon humano (HCT-116) foram triados para os estudos de prospecção química e farmacológica.

Dos 282 extratos orgânicos obtidos do crescimento em pequena escala das bactérias isoladas, 41 extratos apresentaram atividade citotóxica significativa com inibição acima de 75% da proliferação celular. Dentre eles, 24 extratos obtidos da extração com acetato de etila, 15 provenientes de n-butanol e 2 obtidos da extração com metanol (Figura 17).



**Figura 17** - Gráfico ilustrando o percentual de extratos orgânicos ativos obtidos do fermentado biológico das cepas recuperadas das 21 amostras de sedimento do ASPSP.

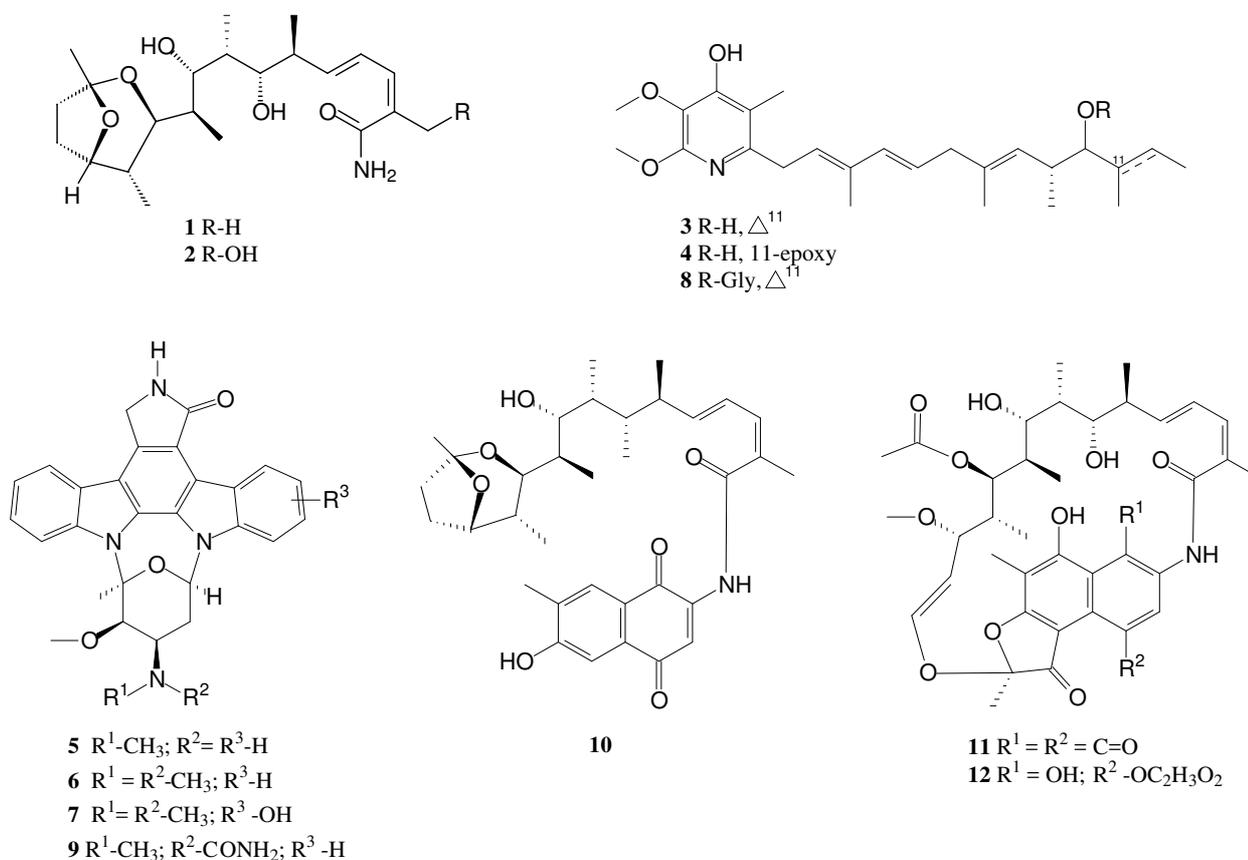
Os 41 extratos ativos foram, então, testados em uma série de concentrações contra a linhagem de HCT-116 por 72h a fim de se determinar a concentração média inibitória ( $CI_{50}$ ). Dos extratos ativos, 31 apresentaram potente atividade citotóxica e 10 indicaram moderada atividade. A  $CI_{50}$  dos extratos variou entre 0,04  $\mu\text{g/mL}$  para o extrato acetato da estirpe BRA-199 até 31,55  $\mu\text{g/mL}$  para o extrato butanólico obtido da cepa BRA-206 (Tabela 6).

**Tabela 6** - Atividade citotóxica dos extratos orgânicos obtidos em cultura de células HCT-116 avaliadas pelo ensaio do MTT após 72h de incubação. Os valores representam suas respectivas  $CI_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) e intervalo de confiança de 95% (IC95%). Doxorubicina utilizada como controle positivo para o ensaio.

Samples	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) CI 95%	$R^2$	Samples	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) CI 95%	$R^2$	Samples	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) CI 95%	$R^2$
<b>BRA-132A</b>	15,07 10,09 - 22,51	0,9467	<b>BRA-175B</b>	7,61 3,38 - 17,14	0,8865	<b>BRA-205A</b>	0,71 0,15 - 3,39	0,7937
<b>BRA-134A</b>	11,13 8,25 - 15,02	0,9753	<b>BRA-176A</b>	4,68 2,55 - 8,57	0,9366	<b>BRA-205B</b>	2,61 0,49 - 13,88	0,7567
<b>BRA-137A</b>	16,06 11,31 - 22,80	0,9625	<b>BRA-177A</b>	4,10 1,25 - 13,46	0,8648	<b>BRA-206A</b>	0,38 0,04 - 3,28	0,5791
<b>BRA-154A</b>	16,02 11,30 - 22,72	0,9578	<b>BRA-180B</b>	7,12 3,12 - 16,22	0,8557	<b>BRA-206B</b>	31,55 9,19 - 108,3	0,8420
<b>BRA-154M</b>	27,89 23,52 - 33,08	0,9764	<b>BRA-183B</b>	1,65 0,78 - 3,49	0,8869	<b>BRA-207A</b>	0,2516 0,04 - 1,45	0,7551
<b>BRA-157A</b>	1,14 0,38 - 3,35	0,8035	<b>BRA-190A</b>	0,12 0,05 - 0,28	0,8746	<b>BRA-207B</b>	0,86 0,22 - 3,42	0,7662
<b>BRA-157B</b>	2,14 0,74 - 6,12	0,8155	<b>BRA-190B</b>	0,74 0,26 - 2,06	0,8179	<b>BRA-207M</b>	22,64 10,74 - 47,71	0,9234
<b>BRA-159A</b>	0,80 0,46 - 1,38	0,9248	<b>BRA-199A</b>	0,04 0,02 - 0,09	0,8064	<b>BRA-210A</b>	0,21 0,06 - 0,69	0,7745
<b>BRA-166A</b>	2,46 0,78 - 7,73	0,7805	<b>BRA-199B</b>	0,18 0,04 - 0,80	0,6547	<b>BRA-210B</b>	0,18 0,07 - 0,45	0,8897
<b>BRA-167A</b>	0,15 0,06 to 0,36	0,8694	<b>BRA-199M</b>	1,49 0,92 - 2,39	0,9461	<b>BRA-211A</b>	20,52 7,29 - 57,74	0,8335
<b>BRA-167B</b>	1,40 0,40 - 4,89	0,7906	<b>BRA-202A</b>	2,19 1,05 - 4,58	0,8989	<b>BRA-213A</b>	0,07 0,02 - 0,24	0,8143
<b>BRA-172A</b>	0,14 0,05 - 0,35	0,8501	<b>BRA-203B</b>	10,11 5,65 - 18,07	0,9040	<b>BRA-213B</b>	6,16 2,90 - 13,08	0,8515
<b>BRA-172B</b>	10,07 5,34 - 18,98	0,8691	<b>BRA-204A</b>	0,70 0,42 - 1,16	0,9516	<b>BRA-214A</b>	11,11 7,89 - 15,66	0,9760
<b>BRA-175A</b>	0,41 0,16 - 1,04	0,8505	<b>BRA-204B</b>	1,04 0,38 - 2,84	0,8341	<b>Doxorubicina</b>	0,21 0,15 - 0,30	0,9757

#### 4.4. Caracterização química dos extratos ativos

A análise por CL-EM (MS e UV) combinada com o banco de dados do programa *AntiMarin* dos 41 extratos ativos (Tabela 6) mostrou a ocorrência de vários compostos com atividade anticâncer, tais como: salinicetal A (1) e B (2), piericidina A (3) e D (4), estaurosporina (5) e seus derivados, N-metil-estaurosporina (6), Hidroxidimetil-estaurosporina (7) e N-carboxamida-estaurosporina (9), glicopiericidina A (8), salinosporamicina A (10), bem como rifamicina S (11) e B (12) (Figura 18). As estruturas desses compostos foram confirmadas através de fragmentos obtidos nos espectros MS/MS (Tabela 7).



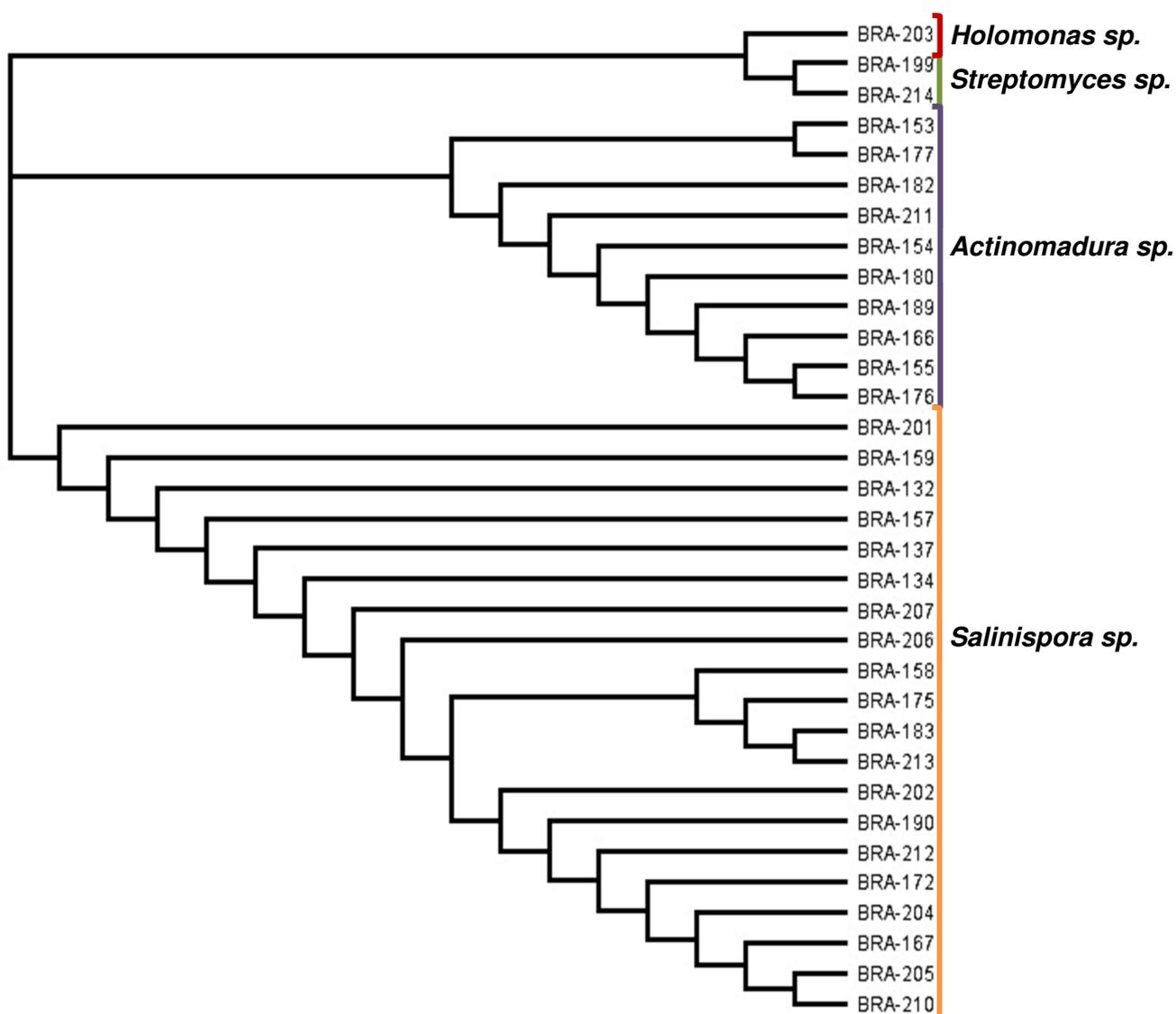
**Figura 18** – Estrutura dos compostos químicos (1 – 12) encontrados nos extratos ativos avaliados por CL-EM.

**Tabela 7** – Caracterização dos extratos ativos obtidos de culturas de microrganismos isolados do ASPSP por CL-EM combinado com análise dos dados de massa obtidos em banco de dados do *AntiMarin*. Erro ppm - partes por milhão. MS<sup>2</sup> - Espectrometria de massa sequencial.  $\lambda_{\max}$  - é o comprimento da onda na qual a fração máxima de luz é absorvida por uma solução (amostra).

<b>Experimental <math>m/z</math> [M + H]<sup>+</sup></b>	<b>Erro ppm</b>	<b>MS<sup>2</sup></b>	<b><math>\lambda_{\max}</math></b>	<b>Composto</b>
<b>396,2745</b>	0,25	-	238	Salinicetal A (1)
<b>412,2694</b>	0,00	168,1350; 327,4227	243	Salinicetal B (2)
<b>416,2795</b>	0,48	398,2642	201; 238	Piericidina A (3)
<b>432,2739</b>	-1,16		201; 238	Piericidina D (4)
<b>467.2080</b>	0,43	338.1223	291	Estaurosporina (5)
<b>481,2232</b>	-0,42	338,1283	291	N-Metil-estaurosporina (6)
<b>497,2178</b>	-1,01	354,1383	290	Hidroxi-dimethyl-estaurosporina (7)
<b>578,3327</b>	0,52			
<b>576,3196</b>	3,13	398,2640	201; 238	Glicopiericidina A (8)
<b>510,2137</b>	0,20	-	291	N-Carboxamida-estaurosporina (9)
<b>598,3019</b>	1.34	-	269; 404	Salinisporamicina A (10)
<b>696,3043</b>	4,02	539,7856	275; 365	Rifamicina S (11)
<b>756,3224</b>	-0,26	724,2808; 696,2554	232; 419	Rifamicina B (12)

#### 4.5. Identificação molecular das cepas ativas

As cepas com perfil promissor quanto à atividade biológica apresentaram uma distribuição filogenética entre os gêneros *Streptomyces*, *Actinomadura* e *Salinispora*. Dentre as 33 cepas identificadas, 20 apresentaram homologia de 100% para a espécie do gênero *Salinispora*, 10 apresentaram maior grau de homologia para o gênero *Actinomadura*, 02 foram identificadas como membros pertencentes ao gênero *Streptomyces* e 01 cepa foi identificada como espécies do gênero *Holomonas* (Figura 19).

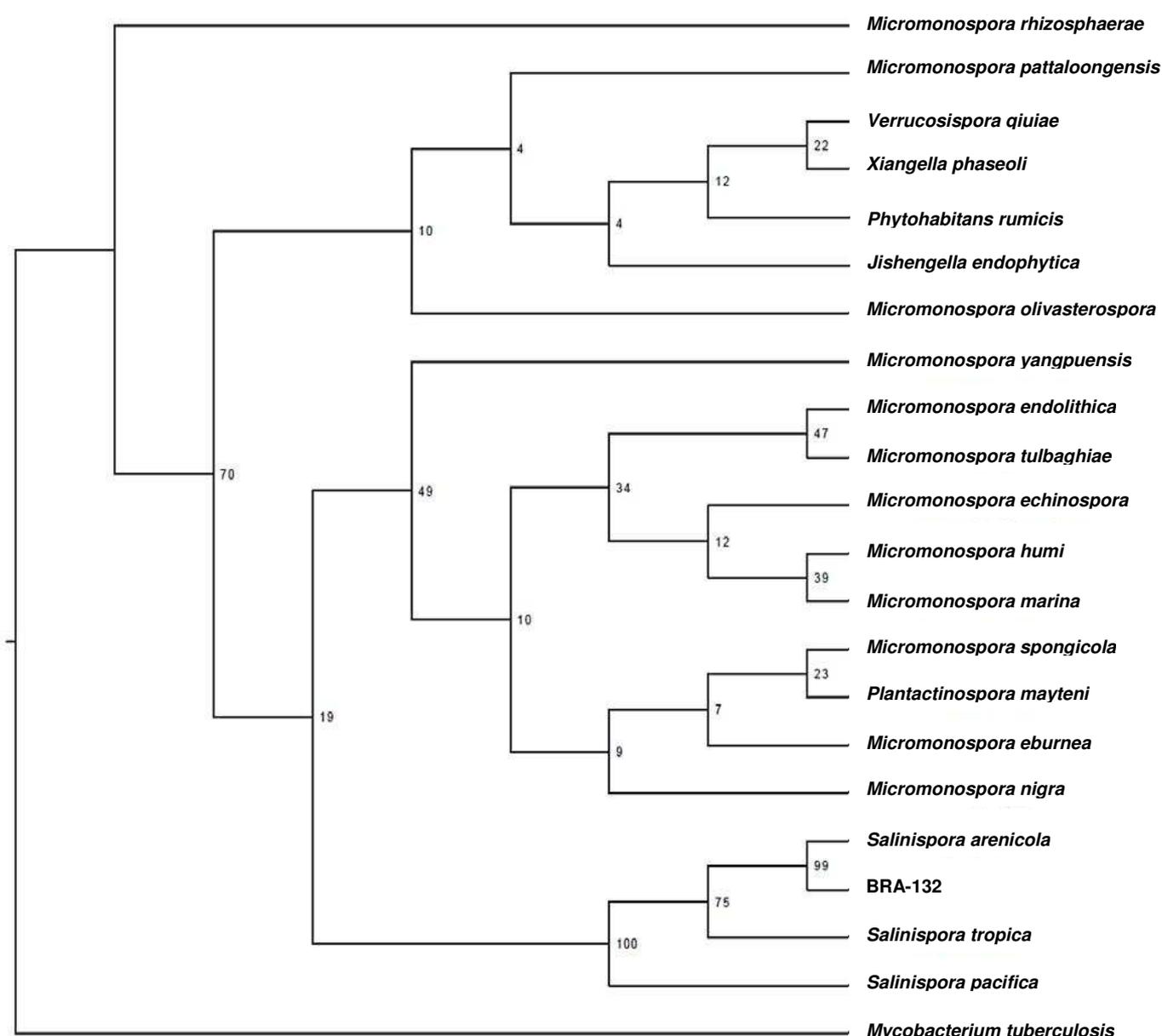


**Figura 19** - Cladograma mostrando o agrupamento das cepas de bactérias que apresentaram atividade citotóxica, recuperadas das 21 amostras de sedimento coletadas em ASPSP.

## 4.6. Estudo químico da cepa BRA-132 (*Salinispora* sp.)

### 4.6.1. Identificação molecular da cepa BRA-132

Um fragmento de 740 bp da seqüência do gene RNAr 16S da cepa BRA-132 foi sequenciado e comparado ao banco de dados do EzTaxon-e. A cepa BRA-132 agrupou-se com maior similaridade ao grupo do gênero *Salinispora*. A maior semelhança em pares observada (99%) foi com a espécie de *Salinispora arenicola* (Figura 20).



**Figura 20** - Árvore filogenética para as seqüências de RNAr 16S da cepa BRA-132 e as seqüências mais similares encontradas no banco de dados EzTaxon-e. Valores de bootstrap para os nódulos são mostrados.

#### 4.6.2. Fracionamento bioguiado da BRA-132 (*Salinispora* sp.)

O extrato acetato obtido da cultura pura da cepa BRA-132, crescida em larga escala (10L), identificada como *Salinispora* sp., foi selecionado para estudo químico por apresentar potente atividade citotóxica com  $CI_{50}$  de 3,96  $\mu\text{g/mL}$ . O extrato acetato obtido de BRA-132 fracionado gerou 10 frações das quais as 06 frações com maior polaridade destacaram-se por apresentar inibição da proliferação celular acima de 75% e apresentaram  $CI_{50}$  variando entre 0,007 $\mu\text{g/mL}$  para fração BRA-132G a 2,50 $\mu\text{g/mL}$  exibido pela fração BRA-132J (Tabela 8).

**Tabela 8** - Atividade citotóxica das frações derivadas do extrato acetado obtido do fermentado biológico da cepa BRA-132 em cultura de células HCT-116 avaliadas pelo ensaio do MTT, 72h.  $IC_{50}$ ,  $CI$  95% ( $\mu\text{g/mL}$ ).

Amostras	%IC	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) $IC_{95\%}$
BRA-132A	11,05	N.T.
BRA-132B	0,00	N.T.
BRA-132C	6,23	N.T.
BRA-132D	19,88	N.T.
BRA-132E	87,21	2,30 0,84 - 6,30
BRA-132F	95,07	0,007 0,005 - 0,008
BRA-132G	100,00	0,09 0,04 - 0,21
BRA-132H	97,02	0,17 0,04 - 0,64
BRA-132I	90,60	1,20 0,15 - 9,24
BRA-132J	77,77	2,50 0,40 - 15,48

N.T. – Não Testado

As frações ativas foram analisadas por *LC/MS* e apresentaram perfil de cromatografia muito semelhante, sendo então reunidas e submetidas a um novo fracionamento em HPLC, este fracionamento forneceu 06 subfrações, as quais subfrações BRA-132(AE-J/1), BRA-132(AE-J/4), BRA-132(AE-J/5) e BRA-132(AE-J/6) apresentaram atividade citotóxica frente a linhagem de células tumorais humana HCT-116 com percentual de inibição acima de 90% (Tabela 9).

**Tabela 9** – Percentual de inibição da proliferação celular (%IC) de células da linhagem HCT-116 *in vitro* das subfrações obtidas da fração BRA-132(E-J) avaliadas pelo ensaio do MTT após 72 h de incubação na concentração de 50µg/mL.

<b>Amostras</b>	<b>% IC</b>	<b>Amostras</b>	<b>% IC</b>
<b>BRA-132(AE-J/1)</b>	90,92	<b>BRA-132(AE-J/4)</b>	95,91
<b>BRA-132(AE-J/2)</b>	27,82	<b>BRA-132(AE-J/5)</b>	100,00
<b>BRA-132(AE-J/3)</b>	26,72	<b>BRA-132(AE-J/6)</b>	99,21

As subfrações BRA-132(E-J/1)/2, BRA-132(E-J/1)/5 e BRA-132(E-J/1)/5 oriundas da fração BRA132(E-J/1) apresentaram inibição da proliferação celular para linhagem HCT-116 com percentuais de 84,30%, 73,50% e 82,38%, respectivamente. A partir da fração BRA-132(E-J/4) foi obtida a subfração ativa BRA-132(E-J/4)/5 cuja atividade citotóxica mensurada através do ensaio antiproliferativo apresentou  $CI_{50}$  de 0,68µg/mL, por sua vez, cinco das subfrações obtidas da fração BRA-132(E-J/5-6) apresentaram potente citotoxicidade com concentrações variando de 0,001µg/mL da fração BRA-132(E-J/5-6)/5 a 3,27µg/mL da fração BRA-132(E-J/5-6)/2 (Tabela 10).

**Tabela 10** - Atividade citotóxica das subfrações derivadas das frações BRA-132(E-J/1), BRA-132(E-J/4) e BRA-132(E-J/5-6) em cultura de células da linhagem HCT-116, avaliadas em dose única de 50 µg/mL e diluições seriadas através ensaio do MTT com 72h de incubação.

Amostra	%IC	Cl <sub>50</sub> (µg/mL) IC95%	Amostra	%IC	Cl <sub>50</sub> (µg/mL) IC95%
(E-J/1)/1	5,76	N.T.	(E-J/1)/4	10,76	N.T.
(E-J/1)/2	84,30	N.D.	(E-J/1)/5	73,50	N.D.
(E-J/1)/3	19,69	N.T.	(E-J/1)/6	82,38	N.D.
(E-J/4)/1	7,81	N.T.	(E-J/4)/4	26,44	N.T.
(E-J/4)/2	5,22	N.T.	(E-J/4)/5	96,54	0,68 0,43 - 1,07
(E-J/4)/3	35,96	N.T.	(E-J/4)/6	9,14	N.T.
(E-J/5-6)/1	5,62	N.T.	(E-J/5-6)/4	93,35	0,05 0,03 - 0,07
(E-J/5-6)/2	94,96	3,27 2,28 - 4,70	(E-J/5-6)/5	102,83	0,001 0,0005 - 0,002
(E-J/5-6)/3	97,29	0,96 0,42 - 2,21	(E-J/5-6)/6	98,77	1,25 0,49 - 3,17

#### 4.6.3. Identificação dos compostos bioativos da cepa BRA-132 (*Salinispora* sp.)

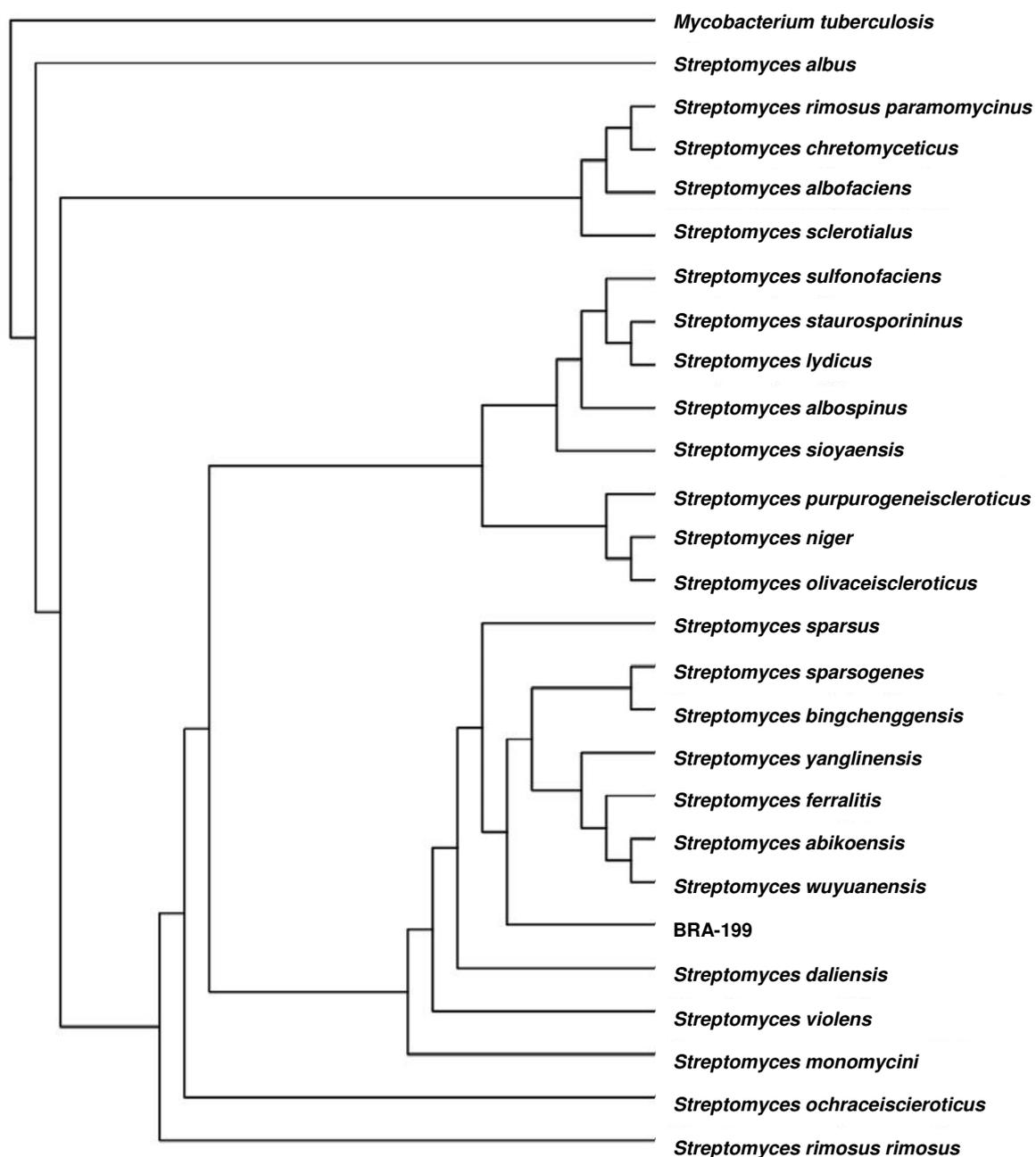
A subfração BRA-132(E-J/5-6)/5 que apresentou potente atividade citotóxica para a linhagem de adenocarcinoma foi submetida a análise por LC/MS acoplado em HPLC para que fosse feita a caracterização e o isolamento do princípio ativo desta fração. A análise realizada para a subfração BRA-132(E-J/5-6)/5 encontrou íons  $m/z$  467 [M + H]<sup>+</sup>,  $m/z$  481 [M + H]<sup>+</sup> e  $m/z$  497 [M + H]<sup>+</sup> que correspondem respectivamente aos compostos **5**, **6** e **7** e o íon  $m/z$  483 [M + H]<sup>+</sup> que não foi identificado (Figura 18).

A subfração BRA-132(E-J/5-6)/4 apresentou íons de massa  $m/z$  497 [M + H]<sup>+</sup> identificado como sendo o composto **7** e a massa  $m/z$  483 [M + H]<sup>+</sup> ainda não identificado. Da subfração BRA-132(E-J/4)/5 foram identificados íons de massa correspondentes aos compostos **5** ( $m/z$  467 [M + H]<sup>+</sup>) e **1** ( $m/z$  396 [M + H]<sup>+</sup>).

## 4.7. Estudo químico da cepa BRA-199 (*Streptomyces* sp.)

### 4.7.1. Identificação molecular da cepa BRA-199

A cepa BRA-199 foi identificada através da análise de sua sequência do gene rRNA 16S. Um fragmento de 740 bp foi sequenciado e comparado ao banco de dados do EzTaxon-e, que apresentou a sequência como sendo mais semelhante para *Streptomyces* sp. A maior semelhança em pares observada (98,62%) foi com a espécie de *Streptomyces daliensis*, assim uma nova análise de probabilidade máxima para as 25 estirpes mais semelhantes (Figura 21), resultou em um clado composto por BRA-199, *S. sparsogenes*, *S. bingchenggens*, *S. yanglinensis*, *S. ferralitis*, *S. abikoensis* e *S. wuyuanensis*. Embora os valores de *bootstrap* terem se apresentado tão baixos, o elevado grau de semelhança unicamente para as estirpes de *Streptomyces* e a sua posição na árvore indicam uma associação da estirpe BRA-199 para este gênero.



**Figura 21** - Árvore filogenética para as sequências de RNAr 16S da cepa BRA-199 e as sequências mais similares encontradas no banco de dados EzTaxon-e. Valores de *bootstrap* para os nós não são mostrados, pois foram menores que 70%.

#### 4.7.2 Fracionamento bioguiado da cepa BRA-199 (*Streptomyces* sp.)

O crescimento em larga escala (10L) da cepa BRA-199, identificada como *Streptomyces* sp., apresentou um rendimento de 170 mg de extrato bruto, este apresentou uma potente atividade antiproliferativa frente a linhagem de adenocarcinoma (HCT-116) com  $CI_{50}$  de 0,07  $\mu\text{g/mL}$ .

O extrato fracionado em coluna cromatográfica de sílica gel gerou sete frações, dentre elas destacaram-se as frações B, C, D que apresentaram inibição média do crescimento celular acima de 80% para as concentrações de 5  $\mu\text{g/mL}$  e 25  $\mu\text{g/mL}$ , e a fração E apresentou percentual acima de 80% na maior concentração testada frente à linhagem de adenocarcinoma humano HCT-116 (Tabela 11).

**Tabela 11** - Inibição da proliferação celular da linhagem tumoral de adenocarcinoma de cólon (HCT-116) pelas frações obtidas do extrato orgânico da cepa BRA-199 (*Streptomyces* sp.). EPM – Erro Padrão da Média.

Amostras	Inibição da proliferação celular (%)					
	5 $\mu\text{g/mL}$			25 $\mu\text{g/mL}$		
	Média (%)	SEM	n	Média	SEM	n
<b>BRA-199A</b>	29,66	1,22	2	33,58	1,15	2
<b>BRA-199B</b>	80,59	6,21	2	87,23	3,39	2
<b>BRA-199C</b>	83,96	5,93	2	100,00	1,03	2
<b>BRA-199D</b>	100,95	1,32	2	100,00	0,56	2
<b>BRA-199E</b>	22,18	3,46	2	83,71	1,18	2
<b>BRA-199F</b>	33,41	0,58	2	52,33	2,58	2
<b>BRA-199G</b>	0,00	3,35	2	33,97	1,31	2

As frações ativas (B, C, D e E) (Tabela 11) foram novamente submetidas a cromatografia e 05 subfrações de cada uma delas foram recolhidas. As subfrações B4 e B5 da fração BRA-199B apresentaram 100% de inibição, as subfrações C1 e C4 apresentaram inibição acima de 90%, enquanto a subfração C5 apresentou inibição de 100% em ambas às concentrações testadas, as subfrações D3, D4 e D5, inibiram com percentual acima de 74%, e as subfrações da fração BRA-199E, E2 e E3, apresentaram percentual acima de 80% da proliferação da proliferação de HCT-116 *in vitro* (Tabela 12).

**Tabela 12** - Inibição da proliferação celular pelas frações obtidas da BRA-199 em ensaio do MTT, utilizando-se a linhagem celular HCT-116.

Amostras	Inibição da proliferação celular (%)					
	5 µg/mL			50 µg/mL		
	Média (%)	SEM	n	Média (%)	SEM	n
<b>BRA-199B1</b>	50,31	1,15	2	100,00	0,27	2
<b>BRA-199B2</b>	15,33	2,77	2	30,86	1,71	2
<b>BRA-199B3</b>	10,30	1,00	2	64,38	3,30	2
<b>BRA-199B4</b>	54,37	16,76	2	100,00	0,18	2
<b>BRA-199B5</b>	100,00	0,14	2	67,29	2,52	2
<b>BRA-199C1</b>	39,16	1,28	2	100,00	0,14	2
<b>BRA-199C2</b>	12,75	2,78	2	42,90	1,26	2
<b>BRA-199C3</b>	41,13	2,87	2	61,27	6,50	2
<b>BRA-199C4</b>	62,70	1,99	2	96,76	0,56	2
<b>BRA-199C5</b>	100,00	0,56	2	100,00	0,30	2
<b>BRA-199D1</b>	9,64	13,81	2	26,75	2,93	2
<b>BRA-199D2</b>	16,24	14,72	2	0,00	8,98	2
<b>BRA-199D3</b>	44,21	2,63	2	82,96	2,55	2
<b>BRA-199D4</b>	50,29	2,23	2	95,04	0,13	2
<b>BRA-199D5</b>	69,41	28,57	2	74,84	6,35	2
<b>BRA-199E1</b>	13,91	1,33	2	11,97	1,75	2
<b>BRA-199E2</b>	24,04	3,75	2	82,91	7,89	2
<b>BRA-199E3</b>	49,44	5,54	2	81,39	1,71	2
<b>BRA-199E4</b>	45,36	2,66	2	69,93	2,31	2
<b>BRA-199E5</b>	73,20	0,15	2	69,23	1,82	2

A subfração ativa B5 foi submetida a cromatografia e analisada em CL-EM, fornecendo as subfrações B5(1), B5(2) e B5(3), a qual se destacou a subfração BRA-199B5(2) que apresentou atividade citotóxica com  $CI_{50}$  de 2,81  $\mu\text{g/mL}$ .

**Tabela 13** - Inibição da proliferação celular *in vitro* da linhagem de adenocarcinoma humano (HCT-116) pelas subfrações obtidas da fração BRA-199B5 através ensaio do MTT.

Amostras	Inibição da proliferação celular (%)					
	5 $\mu\text{g/mL}$			50 $\mu\text{g/mL}$		
	Média (%)	EPM	n	Média (%)	EPM	n
BRA-199B5(1)	36,11	1,65	2	55,74	6,51	2
BRA-199B5(2)	-	-	-	-	-	-
BRA-199B5(3)	12,42	32,77	2	37,51	9,27	2

As subfrações E1 e E2 após serem submetidas a uma nova análise por CL-EM acoplado a CLAE resultou no isolamento e caracterização dos compostos **13**, **14** e **15**, conhecidos como dicetopiperazinas (Figura 22). Os compostos foram testados para atividade citotóxica com as linhagens de adenocarcinoma humano (HCT-116), carcinoma ovariano (OVCAR-8) e glioblastoma (SF-295) (Tabela 14).

**Tabela 14** - Atividade citotóxica das dicetopiperazinas isoladas do extrato orgânico da cepa BRA-199 (*Streptomyces* sp.). A atividade foi avaliada através do ensaio do MTT após 72h de incubação. A  $CI_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) e  $CI_{95\%}$  calculadas por regressão não linear.

Compostos	HCT-116	OVCAR-8	SF-295
	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) IC95%		
<b>13</b>	> 25	> 25	> 25
<b>14</b>	21,4 18,8 - 24,5	18,3 16,7 - 20,0	16,0 13,4 - 19,1
<b>15</b>	> 25	11,9 5,4 - 26,4	> 25

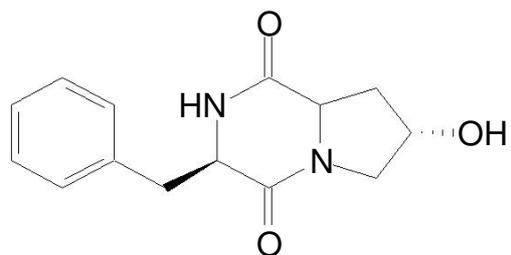
O composto **13** não apresentou atividade citotóxica para as linhagens de células tumorais testadas, o composto **14** por sua vez apresentou atividade moderada para todas as linhagens testadas com  $CI_{50}$  variando entre 16,0  $\mu\text{g/mL}$  em glioblastoma a 21,4  $\mu\text{g/mL}$  em adenocarcinoma de cólon e o composto **15** apresentou  $CI_{50}$  de 11,9  $\mu\text{g/mL}$ , sendo este mais potente contra a linhagem de carcinoma de ovário (Tabela 14).

#### 4.7.3. Isolamento das moléculas bioativas da cepa BRA-199 (*Streptomyces* sp.)

A análise por LC/MS da fração B5(2) apresentou um pico no modo positivo  $m/z$  416  $[M + H]^+$  e com modo negativo  $m/z$  414  $[M + H]^-$ , que quando comparadas com o banco de dados do programa *Antimarin* mostrou ser correspondente para a substância piericidina A (**3**) (Figura 18, Tabela 7).

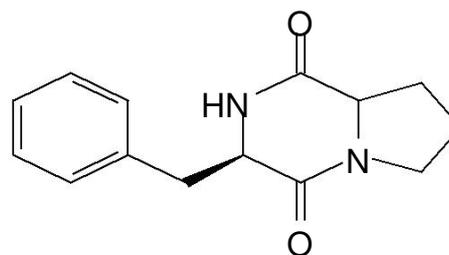
A fração D apresentou picos de massa positiva de  $m/z$  578,3327  $[M + H]^+$  e  $m/z$  576,3196  $[M + H]^-$  que são correspondentes no banco de dados do *Antimarin* para o composto glicopiericidina A (**8**), enquanto que para a fração C foi encontrado uma mistura das substâncias isoladas das frações B5(2) e D (**4**) (Figura 18; Tabela 7).

Ao ser analisada em LC/MS, a fração E1 apresentou um perfil diferente das frações B5(2), C e D, sem resultados para piericidina e seus derivados, sendo então submetida a uma extração de fase sólida (SPE) (Cartucho C18) seguido por análise por HPLC levou ao isolamento e caracterização da dicetopiperazina Ciclo-Fenilalanina-4-Hidroxi-Prolina (**13**) com pico de massa protonada  $m/z$  261,1227  $[M + H]^+$ . Ao analisar a fração AE2 foi encontrado picos de massa protonadas  $m/z$  245.1285  $[M + H]^+$  e  $m/z$  284.1398  $[M + H]^+$  os quais correspondem aos compostos Ciclo-(Fenilalanina-Prolina) (**14**) e Ciclo-(Triptofano-Prolina) (**15**), respectivamente (Figura 22).



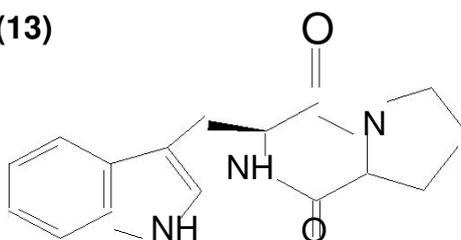
**Ciclo- Fenilalanina-4-Hidroxi-Prolina**

(13)



**Ciclo-(Fenilalanina-Prolina)**

(14)



**Ciclo-(Triptofano-Prolina)**

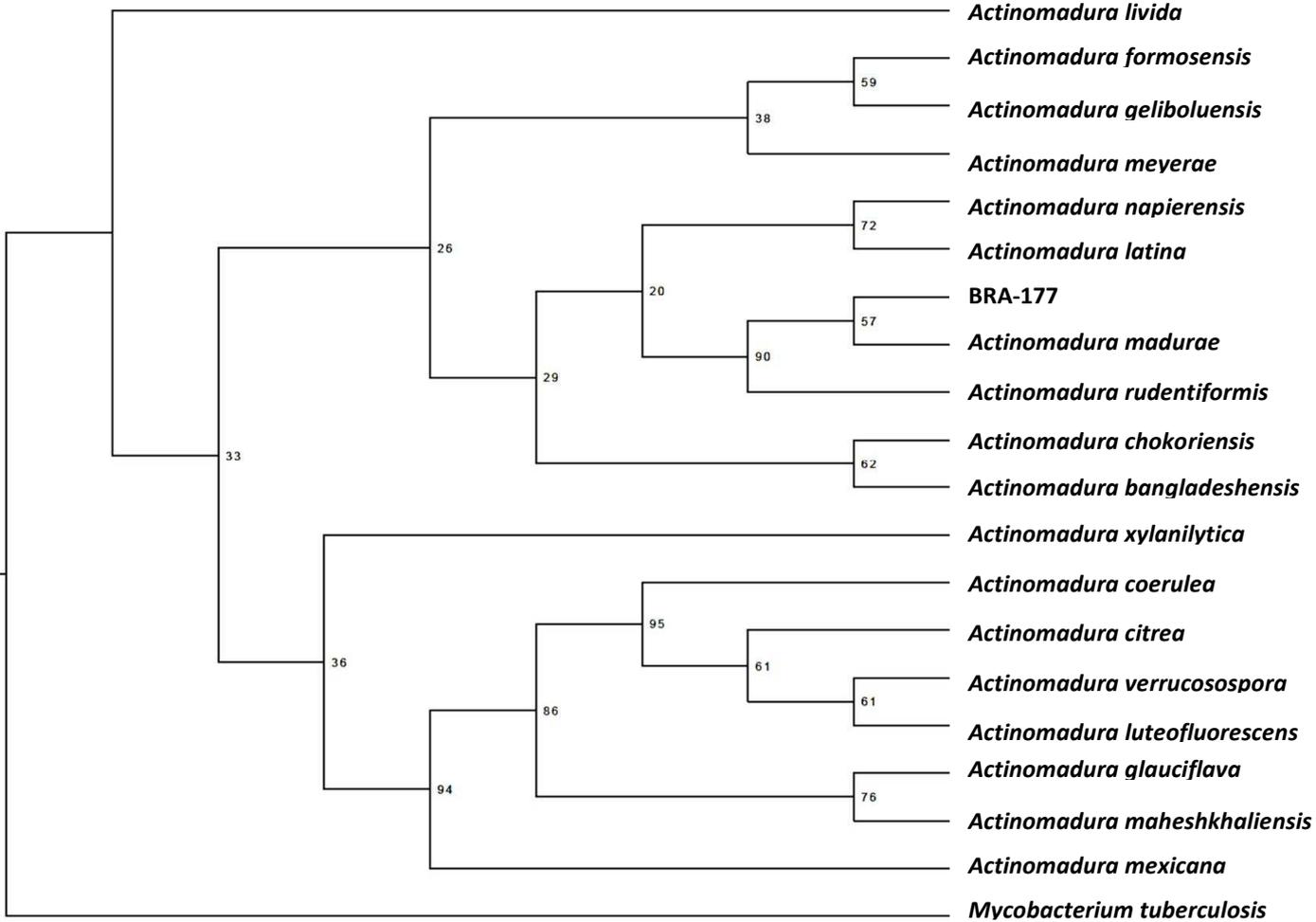
(15)

**Figura 22** - Estrutura química das dicetopiperazinas **13** - **15** isoladas da cepa BRA-199 (*Streptomyces* sp.) recuperada das amostras de sedimento do ASPSP.

### 4.8. Estudo químico da cepa BRA-177 (*Actinomadura* sp.)

#### 4.8.1. Identificação molecular da cepa BRA-177

Um fragmento de 740bp da seqüência do gene RNAr 16S da cepa BRA-177 foi sequenciado e comparado ao banco de dados do EzTaxon-e. A cepa BRA-177 agrupou-se com maior similaridade ao grupo do gênero *Actinomadura*. A maior semelhança em pares observada (57%) foi com a espécie de *Actinomadura madurae*, que se agrupam com semelhança de 90% para a espécie *Actinomadura rudentiformis* (Figura 23).



**Figura 23** - Árvore filogenética para as seqüências de RNAr 16S da cepa BRA-177 e as seqüências mais similares encontradas no banco de dados EzTaxon-e. Valores de bootstrap para os nódulos são mostrados.

#### 4.8.2. Fracionamento bioguiado da cepa BRA-177 (*Actinomadura sp.*)

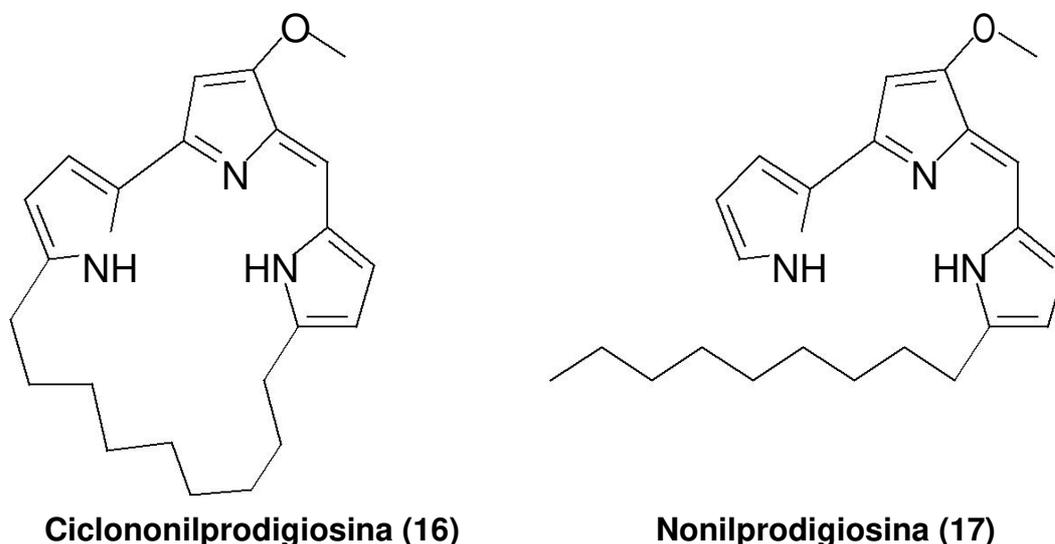
O extrato acetato obtido do crescimento em larga escala (10L) da cepa BRA-177, identificada como *Actinomadura madurae*, exibiu potente atividade citotóxica nas células da linhagem de HCT-116, inibindo a proliferação *in vitro* em concentração de 0,13 µg/mL. A partir do fracionamento desse extrato foram recolhidas 11 frações que depois de testadas qualitativamente, foi observado que 07 delas apresentaram percentual de inibição acima de 75%. Dentre as frações ativas, destacou-se a fração BRA-177H com  $CI_{50}$  de 0,08 µg/mL, sendo esta a mais ativa das frações, o restante das frações também apresentaram forte atividade citotóxica com  $CI_{50}$  variando entre 4,44 µg/mL mostrada pela fração BRA-177I a 9,07 µg/mL da fração BRA-177J (Tabela 15).

**Tabela 15** - Atividade citotóxica *in vitro* na linhagem HCT-116 do extrato bruto da cepa BRA-177 e sua frações avaliados pelo ensaio do MTT após 72h de incubação.

<b>Amostras</b>	<b><math>CI_{50}</math> (µg/mL) IC 95%</b>	<b>Amostras</b>	<b><math>CI_{50}</math> (µg/mL) IC 95%</b>
<b>BRA-177EB</b>	0,13 0,03 - 0,48	<b>BRA-177F</b>	6,59 4,55 - 9,54
<b>BRA-177A</b>	> 50	<b>BRA-177G</b>	> 50
<b>BRA-177B</b>	> 50	<b>BRA-177H</b>	0,08 0,05 - 0,12
<b>BRA-177C</b>	> 50	<b>BRA-177I</b>	4,44 3,07 - 6,42
<b>BRA-177D</b>	6,04 4.33 - 8.43	<b>BRA-177J</b>	9,07 3,70 - 22,21
<b>BRA-177E</b>	4,54 2.23 - 9.24	<b>BRA-177L</b>	> 50

### 4.8.3. Caracterização e isolamento dos compostos ativos da BRA-177

A análise dessas frações por espectrometria de massas, seguida de consulta ao banco de dados do software *AntiMarin*, permitiu a identificação da ciclononilprodigiosina (**16**) (Figura 24) ( $m/z$  364,2362  $[M + H]^+$ ) nas frações D a F (Figura 30), e o composto citotóxico nonilprodigiosina (**17**) (Figura 24) ( $m/z$  366,2517  $[M + H]^+$ ) isolada na fração H (Figura 31) que apresentou  $CI_{50}$  de 1,10  $\mu\text{g/mL}$ . Posteriormente, o fracionamento cromatográfico da fração BRA177E em coluna de  $\text{SiO}_2$  resultou no isolamento da ciclononilprodigiosina (**16**), a qual teve sua estrutura confirmada com base nos dados de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 29).



**Figura 24** - Estrutura química dos derivados de prodigiosina **16** e **17** isolados das frações ativas da cepa BRA-177.

## 5. DISCUSSÃO

A prospecção de produtos naturais de origem marinha, nestes últimos 50 anos, levaram à descrição de cerca 20.000 moléculas com esqueletos carbônicos únicos e potentes propriedades farmacológicas associadas. Esses produtos de origem marinha caracterizam-se por uma ampla diversidade estrutural, que parece refletir a própria exuberância da diversidade biológica encontrada no ambiente (Mayer *et al.*, 2010; Molisnki *et al.*, 2009; Gerwick & Moore, 2012; Imhoff *et al.*, 2011; Montaser & Luesch, 2011; Cragg & Newman, 2013). Além de suas estruturas peculiares, produtos naturais marinhos possuem uma extraordinária diversidade de alvos moleculares com seletividade marcante, o que aumenta sobremaneira o potencial farmacológico e terapêutico dessas moléculas (Newman & Cragg, 2006). A grande maioria dos alvos identificados é relevante no tratamento do câncer, e é exatamente no estudo e na terapêutica dessa doença que podemos ver o maior impacto das substâncias de origem marinha (Mollinski *et al.*, 2009; Cragg & Newman, 2013).

Os estudos realizados em ambientes remotos, como aqui apresentado para o Arquipélago de São Pedro e São Paulo (ASPSP), ganha crescente interesse a medida que atrela a prospecção biotecnológica ao estudo de diversidade, ampliando o conhecimento dos ecossistemas. Vale ressaltar que o presente trabalho realizado é um estudo pioneiro para o ASPSP, pois não se há registro da diversidade de microrganismos cultiváveis e não cultiváveis presentes no sedimento marinho do ASPSP.

O baixo grau de diversidade bacteriana presente nos sedimentos do ASPSP foi refletido pelos padrões de bandas do DGGE. Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que existe uma semelhança acentuada de 62,8% para o grupo de Bacteria, enquanto, para Archaea, a similaridade foi de 32,9%. O grupo das bactérias apresentou 61 UTOs entre os dois semestres, enquanto que para o grupo arqueias foi encontrado apenas 32 UTOs, e foi demonstrado ser um grupo menos diversificado nesta região.

Um estudo realizado para determinar a composição da comunidade microbiana do sedimento marinho anóxico coletado na Baía de Cádiz, Espanha, encontrou uma proporção de 70:30 para Bacteria:Archaea (Köchling *et al.*, 2011).

Os resultados obtidos para este estudo são bastante semelhantes ao encontrado no presente estudo. Os sedimentos marinhos são comumente descritos pela baixa abundância de microrganismos do Domínio Archaea (BOWMAN et al., 2000; MUSAT et al., 2006)

Um estudo realizado no ASPSP por Moreira e colaboradores, realizou a primeira caracterização de bactérias heterotróficas cultiváveis do coral escleractíneo *Madracis decactis*, isolando 403 estirpes identificadas como membros de *Photobacterium*, *Bacillus* e *Vibrio*. Além disso, caracterizaram as bactérias cultiváveis de *Hermodice carunculata*.

É comum o uso de vários tipos de pré-tratamentos e meios de cultura seletivos para favorecer o isolamento de actinomicetos marinhos associadas ao sedimento (KIM et al., 1994; JENSEN et al., 2005; HAMEŞ-KOCABAŞ e UZEL, 2012; ÖZCAN et al., 2013).

A aplicação de técnicas de pré-tratamento físico e químico e o uso de meios de cultura seletivos podem favorecer o crescimento de grupos de actinomicetos raros. O calor e a dessecação irão favorecer aqueles grupos de actinomicetos formadores de esporos aéreos, enquanto que o pré-tratamento das amostras com 1,5% de fenol e o uso do meio de cultura com ácido-húmico e vitaminas suplementado com ácido nalidíxico e tunicamicina favorecem o crescimento de bactérias do gênero *Micromonospora* (HAYAKAWA, 2008). Outras técnicas de pré-tratamento como a centrifugação em gradientes de sacarose aplicada para favorecer o crescimento de *Nocardia*, a irradiação por micro-ondas, filtração em filtros de membrana de celulose e a adição de sal ao meio de cultura podem favorecer o crescimento e isolamento de actinomicetos raros (SUBRAMANI e AALBERSBERG, 2013; XIONG et al., 2013; HAYAKAWA, 2008).

As amostras de sedimento coletadas do arquipélago São Pedro e São Paulo foram submetidas a dois métodos diferentes de processamento. O primeiro método empregado foi o carimbo/dessecação (M1), onde foram recuperadas aproximadamente 65% (173 cepas) do total de cepas. Empregando o método diluição/aquecimento (M2), foram isoladas aproximadamente os 35% (95 cepas) restantes do número total de cepas.

Jensen e colaboradores, em 2005, aplicaram 8 diferentes técnicas de pré-tratamento em 227 amostras de sedimentos coletadas ao redor da ilha de Guam no trecho sul das Ilhas Marianas do Norte, localizado na porção tropical do oceano Pacífico. Os métodos carimbo/dessecação e diluição/aquecimento foram aplicados separadamente à maioria das amostras ali coletadas e resultaram na recuperação de 44 e 47% de actinomicetos, respectivamente, entre todas as cepas bacterianas recuperadas, inferindo, assim, que ambas as metodologias são igualmente eficientes para o isolamento de actinomicetos. Entretanto, quando ambas as técnicas foram usadas em combinação, observou-se que os actinomicetos assumiam, agora, 70% das cepas bacteriana isoladas das amostras, aumentando, consideravelmente, a eficiência desses processos.

No presente estudo, entretanto, o método carimbo/dessecação representou mais da metade dos actinomicetos isolados do sedimento marinho quando comparada ao método de diluição/aquecimento.

Os métodos de pré-tratamento aqui empregados foram também utilizados por Freel e colaboradores em 2012 visando o isolamento seletivo de cepas do gênero *Salinispora*. Das 671 amostras de sedimento marinho coletados das ilhas Fiji, foram isoladas 750 colônias com características típicas do gênero *Salinispora*, como a coloração laranja e presença de esporos enegrecidos encontrados na superfície das colônias.

Recentemente, Dias (2013) realizou 3 técnicas de pré-tratamento para um estudo da biodiversidade de actinobactérias do sedimento marinho coletado no Arquipélago da Madeira, localizado a 978km a sudoeste de Lisboa. Dos métodos de pré-tratamento empregados, dois são comparáveis aos utilizados no presente trabalho, enquanto que o terceiro é uma variação do método de diluição/aquecimento, no qual o pesquisador utiliza apenas metade do volume da suspensão obtida. Através da utilização do terceiro método foram isoladas 333 estirpes morfológicamente semelhantes a actinomicetos (Dias, 2013).

Estudos recentes realizados por Guimarães (2013) para o sedimento da praia de Paracuru, localizada na costa cearense, recuperou um total de 26 estirpes de actinomicetos utilizando as mesmas metodologias empregadas no presente trabalho. Neste mesmo trabalho, Guimarães relata o isolamento de 18 cepas utilizando a

metodologia M1 e apenas 8 cepas utilizando a metodologia M2, ressaltando a maior eficiência da metodologia M1. Ainda que a dimensão do estudo seja cerca de 10 vezes menor, a proporção percentual é semelhante a encontrada para as cepas de actinomicetos isoladas no presente estudo.

A utilização de diferentes meios de cultura é muito importante para permitir a recuperação de diversas estirpes, tal como sugerido pela diferença fenotípica nos isolados. A concentração de nutrientes tem sido discutida como um importante fator impulsionado o crescimento de bactérias em placas de ágar (JENSEN et al., 2005; MALDONADO et al., 2005; DAS, LYLA e AJMAL KHAN, 2008; HAMEŞ-KOCABAŞ e UZEL, 2012)

No presente estudo, o número de cepas recuperadas utilizando o método M1 foi comparável para os três meios de culturas empregados neste trabalho, entretanto quando comparado os três meios de cultura para o método M2, foi observado que os meios SCA e TMA favoreceram o maior isolamento de cepas.

O amido, utilizado como fonte de carbono, e a caseína, empregada como fonte de nitrogênio, que compõem o meio SCA são nutrientes que favorecem o desenvolvimento de actinomicetos, sendo este considerado um meio rico (MALDONADO, STACH, et al., 2005). Os estudos apresentados no trabalho de Das e colaboradores (2008), com actinomicetos recuperados do sedimento do Golfo da Bengala, na Índia mostraram que o meio SCA foi melhor para o desenvolvimento dos actinomicetos quando comparado ao meio ISP2, formulado com extrato de malte e extrato de levedura (DAS, LYLA e AJMAL KHAN, 2008). O meio TMA apresenta em sua composição concentrações relativamente baixas de nutrientes, o que reduz naturalmente o número de outras bactérias que apresentam sensibilidade ao estresse nutricional e favorece o crescimento de actinomicetos (HAMEŞ-KOCABAŞ e UZEL, 2012; JENSEN et al., 2005).

O estudo realizado no sedimento da praia de Paracuru, realizado por Guimarães (2013), mostrou que a utilização dos meios TMA e SCA rendeu 42 e 31% do total de cepas recuperadas, respectivamente, sendo estes mais eficientes no desenvolvimento dos actinomicetos marinhos. Para o presente trabalho os resultados observados utilizando os mesmos meios de cultura apresentaram porcentagens similares, tendo um rendimento de 43% observado para o meio TMA enquanto que para o meio SCA foi de aproximadamente 39%.

Das 268 estirpes recuperadas, 94 foram cultivadas em meio líquido, e submetidas a uma extração química com acetato de etila, metanol e n-butanol, tal como descrito nos procedimentos experimentais. Isto rendeu um total de 224 extratos, triados pela atividade citotóxica, dentre os quais 41 foram significativamente ativos, inibindo mais de 70% da proliferação de células de adenocarcinoma humano (HCT-116). Entre os extratos ativos, 24 foram obtidos em acetato de etila, 15 em butanol e 2 em metanol.

No presente estudo, os extratos obtidos em acetato de etila representam 56% do total de extratos ativos. Vale ressaltar que em trabalhos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa têm mostrado que os extratos acetato de etila são frequentemente mais citotóxicos neste modelo celular que os extratos metanólicos (JIMENEZ et al., 2013; ARTHAUD et al., 2012).

A caracterização química desses extratos por desreplicação permitiu identificar a presença de vários compostos já conhecidos por apresentarem atividade citotóxica. No presente estudo as análises por CL-EM dos extratos ativos detectou íons de massa correspondes aos compostos salinictais A (1) e B(2), piericidina A (3) e D (4), estaurosporina (5) e seus derivados, N-metil-estaurosporina (6), hidroxidimetil-estaurosporina (7), glicopiericidina A (8), N-carboxamida-estaurosporina (9), salinisporamicina A (10), além dos antibióticos rifamicinas S (11) e B (12).

A fragmentação por massa foi utilizada para suportar as estruturas dos compostos 5, 6 e 7. O íon de massa  $m/z$  338,1283, observado para os compostos 5 e 6, foi formado pela eliminação de  $C_6H_{11}NO_2$  e  $C_7H_{13}NO_2$ , respectivamente. Seguindo a mesma via de fragmentação, o composto 7, que exibiu o íon de massa  $m/z$  354,1383, pode ser justificado pela presença de um grupo hidroxila no núcleo poliaromático. O mecanismo para essa fragmentação foi proposto anteriormente por Andreo e colaboradores (ANDRÉO et al., 2012).

As estaurosporinas foram descobertas em 1977 através de métodos de detecção química na cultura do actinomiceto (*Streptomyces* AM-2282<sup>T</sup>) enquanto era realizado um estudo de triagem para detecção de alcaloides (OMURA et al., 1977). A cepa *Streptomyces* AM-2282<sup>T</sup> foi posteriormente renomeada como sendo a espécie *Streptomyces staurosporeus* AM-2282<sup>T</sup> em 1977, *Saccharothrix aerocolonigenes* subsp. *staurosporea* AM-2282<sup>T</sup> em 1995, e, posteriormente, renomeada para *Lentzea albida* em 2002 (XIE, et al., 2002; TAKAHASHI, et al., 1995).

Estaurosporinas são moléculas que pertencem ao grupo dos alcaloides indol-carbazol e apresentam uma variedade de propriedades biológicas importantes tais como a antifúngica, antibacteriana, anti-hipertensiva e anticâncer, sendo que já foram isoladas de vários gêneros de actinomicetos como *Streptomyces*, *Saccharothrix*, *Lentzea*, *Lechevalieria*, *Nocardia*, *Nocardiosis*, *Nonomuraea*, *Actinomadura*, *Micromonospora*, *Salinisporas*, bem como a partir de myxomycetes e cianobactérias (HEWAVITHARANA, et al., 2009 ;SÁNCHEZ, MÉNDEZ & SALAS, 2006).

Derivados de estaurosporina também têm sido frequentemente isolados de invertebrados marinhos, tais como esponjas, tunicados, briozoários e moluscos. No entanto, ainda não se sabe se os invertebrados realmente têm genes para a biossíntese desses compostos, já que muitos produtos naturais de invertebrados marinhos são produzidos por microrganismos associados (SÁNCHEZ, MÉNDEZ & SALAS, 2006).

O MS/MS da rifamicina B (**12**) apresentou os íons  $m/z$  696.2554 e 724.2808, o anterior corresponde à eliminação de  $C_2H_4O_2$  gerando rifamicina S (**11**). As rifamicinas são um grupo de antibacterianos clinicamente importantes da família das ansamicinas, isolados primeiramente em 1959 a partir de um processo de fermentação de *Streptomyces mediterranei*, atualmente descrita como *Amycolatopsis rifamycinica* (YU et al., 1999). As rifamicinas são moléculas conhecidas por serem produzidas por espécies de actinomicetos isolados de solo, como por exemplo, a espécie *Amycolatopsis mediterranei*, a qual síntese de rifamicina foi mais intensivamente estudada (SCHUPP et al., 1998; SENSI, MARGALITH E TIMBAL, 1959).

Os compostos salinicetal A (**1**), salinicetal B (**2**) e salinisporamicina A (**10**), não demonstraram qualquer fragmento de íons para suas estruturas, sendo então identificados com base em HRMS e dados espectrais de UV. Além disso, a relação biossintética entre as estruturas de salinictais, salinisporamicina e rifamicinas, apoiou esta proposição (MATSUDA et al., 2009; WILLIAMS et al., 2007).

Foi detectada a presença dos compostos **1** e **2** em 14 estirpes recuperadas do sedimento do arquipélago São Pedro e São Paulo. É digno de ressaltar que os compostos **1** e **2**, até o presente momento foram isolados apenas a partir de *Salinispora arenicola* (WILLIAMS et al., 2007).

A análise por desreplicação detectou ainda íons de massa  $m/z$  416,2795 que corresponde ao composto piericidina A (**3**),  $m/z$  432,2739 (**4**) e o íon de massa  $m/z$  578,3327 referente ao composto glicopiericidina A (**8**).

A molécula de piericidina A tem sido relatada como um potente inseticida isolado de *Streptomyces mobaraensis* e teve sua estrutura elucidada em 1965 por Tamura e Takahashi. Entretanto, YOSHIDA, SHIRAIISHI e TAKAHASHI, (1977) afirmaram através de um estudo de revisão sobre a estereoquímica da substância, que a mesma foi isolada por TAMURA e colaboradores em 1963. Ao longo do tempo, observou-se a produção de diversas formas de piericidinas, sendo estas produzidas por outras espécies do gênero de *Streptomyces* (YOSHIDA, SHIRAIISHI e TAKAHASHI, 1977).

Através da análise filogenética das sequências do gene 16S rRNA, das 33 estirpes selecionadas foi possível identificar a presença de quatro gêneros da ordem Actinomycetales, sendo eles *Salinispora*, *Actinomadura*, *Streptomyces* e *Holomonas*.

Cerca de 60% das estirpes selecionadas pela atividade citotóxica do seu extrato orgânico foram identificadas como sendo representantes do gênero *Salinispora*, 30% são pertencentes ao gênero *Actinomadura*, 6% foram identificados como estirpes do gênero *Streptomyces* e 3%, correspondente a 1 cepa, como sendo do gênero *Holomonas*.

Por outro lado, em um estudo similar realizado por Dias (2013), identificou-se uma maior quantidade de gêneros da ordem Actinomycetales, como os gêneros *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Salinispora*, *Nocardiopsis*, *Verrucosipora*, *Kocuria*, *Nonomuraea*, *Brevibacterium*, *Actinomadura* e *Micrococcus*. Neste mesmo estudo, Dias apresentou que o gênero *Streptomyces* foi o grupo com maior número de representantes, com 37 estirpes (43%), seguido pelo gênero *Micromonospora*, com 14 estirpes (19%), e o gênero *Salinispora* foi o terceiro grupo mais abundante encontrado em suas amostras, com 10 estirpes (13%).

Em estudos realizados em amostras de sedimento marinho, a tendência mais comum é a de representantes do gênero *Streptomyces* e *Micromonospora* serem os grupos mais abundantes isolados, entretanto o uso de água do mar nos meios de cultura tem favorecido o isolamento de actinomicetos marinhos obrigatórios como o gênero *Marinospora* ou a estirpe *Aeromicrobium marinum* e o gênero *Salinispora*, que tem sido isolado em diversas regiões do planeta (SUBRAMANI & AALBERSBERG,

2012; PRIETO-DAVÓ, FENICAL E JENSEN, 2008; BREDHOLDT, et al., 2007).

O isolamento do gênero *Salinispora* já foi descrito para esponjas marinhas e sedimentos marinhos de áreas costeiras de zonas tropicais e subtropicais do planeta, onde se encontra amplamente distribuído. O grupo *Salinispora* já foi isolado no Havai, Mar Cortez, Costa Rica (Costa do Pacífico), Bahamas, Ilhas Virgens (US), Mar Vermelho, Ilha de Guam, Ilha de Palau, Ilhas Fiji, Grande Barreira de Coral (Austrália), Mar do Sul da China e Arquipélago da Madeira (DIAS, 2013; FREEL, EDLUND & JENSEN, 2012).

O gênero *Salinispora* foi inicialmente identificado como MAR1 e considerado como pertencentes à família *Micromonosporaceae*. As análises filogenéticas destas bactérias revelam três clados distintos, mas estreitamente ligados, o que corresponde à espécie *Salinispora arenicola*, *Salinispora tropica*, e *Salinispora pacifica* (MALDONADO et al., 2005; MINCER et al., 2002).

*Salinisporas* são bactérias aeróbias, gram-positivas que apresentam um denso micélio não fragmentar e esporos sem motilidade enegrecidos na superfície da colônia, como é típico do gênero intimamente relacionado *Micromonospora* (MALDONADO, et al., 2005; MINCER, et al., 2002). Este grupo foi descrito como o primeiro grupo de actinomicetos marinhos obrigatórios, pois necessita de água do mar ou meio de cultura suplementado com sódio para seu crescimento, sendo visíveis em cultura entre 3 e 6 semanas, com uma temperatura entre os 10-30°C e pH entre 7-12 (MALDONADO et al., 2005).

As cepas pertencentes ao gênero *Salinispora* são caracterizadas pela presença de hifas vegetativas finamente ramificadas e não fragmentar, e pela pigmentação, que vai de laranja pálido ao preto quando a colônia está em processo de esporulação. Produz frequentemente pigmentos difusíveis no substrato que podem ir do castanho-escuro ao preto, laranja brilhante ou rosa (MALDONADO et al., 2005).

Entre as 23 cepas produtoras de extratos citotóxicos foram selecionadas 3 cepas de características fenotípicas diferentes para um crescimento em larga escala, afim de realizar um fracionamento bioguiado pela atividade citotóxica e sua identificação molecular.

O extrato da cepa denominada de BRA-132A apresentou moderada atividade citotóxica com valor de  $CI_{50}$  igual a 15,07  $\mu\text{g/mL}$ . Após seu crescimento em larga escala no meio de cultura A1 suplementado o extrato acetato da cepa BRA-132A apresentou um aumento no seu potencial citotóxico revelando uma potente atividade com  $CI_{50}$  de 3,96  $\mu\text{g/mL}$ .

A análise filogenética do gene RNAr 16S revelou que a cepa BRA-132 agrupou-se com maior similaridade a espécie *Salinispora arenicola*. As espécies, *Salinispora tropica*, *Salinispora arenicola* e *Salinispora pacifica* são as únicas integrantes desse gênero, e estão amplamente distribuídas em sedimentos marinhos das zonas tropicais e subtropicais, sendo a espécie *S. arenicola* a que exibe maior variedade geográfica (JENSEN & MAFNAS, 2006; MALDONADO, et al., 2005).

O gênero *Salinispora* é claramente determinado com base na filogenia do gene RNAr 16S, as três espécies compartilham 99% de identidade de sequência 16S e são melhor resolvidas por meio de marcadores filogenéticos menos conservados. Até o momento, nenhuma diversidade intra-específica tem sido relatada para *S. tropica*, e apenas algumas alterações de nucleotídeos foram observados em *S. arenicola*, incluindo dois polimorfismos que são restritos às populações do Mar de Cortez (JENSEN & MAFNAS, 2006).

Tendo em vista os resultados promissores encontrados para cepa BRA-132, recuperada do sedimento marinho, decidiu-se investigar a composição química do extrato acetato de etila e realizar o fracionamento bioguiado pela atividade citotóxica.

As frações oriundas da partição do extrato acetato obtidas da fermentação em larga escala da estirpe BRA-132 foi realizada utilizando solventes orgânicos com diferentes polaridades, puros ou em mistura binária. Das frações obtidas da partição química do extrato bruto, as 6 frações obtidas de acetato de etila, metanol e  $\text{H}_2\text{O}$ , puros ou em mistura, mostraram-se ativas para a linhagem testada. Estas quando comparadas por análise em HPLC em coluna de fase reversa apresentaram-se muito semelhantes e por consequência foram reunidas.

Vale ressaltar que, o fracionamento bioguiado de extratos hidroalcoólicos de invertebrados marinhos realizados anteriormente pelo nosso grupo de estudos, as frações com polaridade intermediárias são frequentemente as mais promissoras quanto à atividade citotóxica (FERREIRA, 2010; WILKE, 2009; JIMENEZ, 2008).

A análise por CL/EM permitiu a caracterização e identificação dos princípios ativos presentes nas frações ativas, que correspondem a estaurosporina (5) e aos seus derivados N-metil-estaurosporina (6) e hidroxí-dimetil-estaurosporina (7).

Em um estudo para detecção de estaurosporinas a partir de extratos obtidos de cultura de actinomicetos do gênero *Salinispora*, Hewavitharana e colaboradores (2009) detectaram entre 0,1 e 5mM de estaurosporinas presentes em 4 dos 15 extratos analisados.

JIMENEZ e colaboradores, 2012, realizaram o fracionamento bioguiado do extrato hidroalcolico obtido da ascidia *Eudistoma vancouveri*. Este estudo resultou numa fração ativa que quando analisada por CL-ES apresentou um único pico.

O estudo químico dessa fração resultou no isolamento dos compostos 2-hidroxi-7-oxoestaurosporina e o 3-hidroxi-7-oxoestaurosporina. ANDRÉO e colaboradores, 2012, posteriormente, realizaram um estudo para detecção dos derivados de estaurosporinas, 2-hidroxi-7-oxoestaurosporina e o 3-hidroxi-7-oxoestaurosporina, em actinomicetos associados a ascidia *E. vancouveri*. Este estudo permitiu identificar a presença de estaurosporina no extrato acetato de etila da cepa EVA-1063 identificada como sendo membro do gênero *Streptomyces*, entretanto não foi possível identificar a presença dos derivados de estaurosporina obtidos do extrato da ascidia. Estes resultados sugerem que os compostos 2-hidroxi-7-oxoestaurosporina e o 3-hidroxi-7-oxoestaurosporina são resultado de uma posterior metabolização da estaurosporina produzida pela cepa de *Streptomyces* associada.

Jensen e colaboradores em 2006, ao examinar 30 estirpes de *S. arenicola* de localidades geográficas distintas, observaram que todas as culturas produziam moléculas bem conhecidas como rifamicinas e estaurosporinas, bem como o novo composto bicíclico salinicetal. Esta molécula, por sua vez, compartilha algumas características biossintéticas com rifamicina (JENSEN, et al., 2006). O íon de massa para o composto salinicetal foi detectado na fração ativa BRA-132(E-J/4)/5. A identificação do Salinicetal e de estaurosporina e derivados reforça o resultado encontrado para filogenia da cepa BRA-132.

A espécie *S. arenicola* apresenta uma distribuição cosmopolita, sendo encontrada em todos os locais em que o gênero *Salinispora* foi isolado. Este tipo de distribuição não é compartilhado entre as outras duas espécies pertencentes ao gênero. A espécie *S. pacífica* foi descrita apenas na costa do Mar Vermelho e no

Oceano Pacífico de Guam, Palau, Fiji e da costa leste da Austrália. *S. tropica*, por sua vez, apresenta uma distribuição ainda menor que a observada para as outras espécies, pois até o presente momento esta espécie foi isolada apenas do sedimento nas Bahamas (FREEL et al. de 2011; JENSEN E MAFNAS 2006; KIM et al., 2005)

O trabalho de Ziemert e colaboradores (2014), a partir de uma abordagem genômica, realizou um estudo das vias de biossíntese de metabólitos secundários do genoma de 75 cepas do actinomiceto marinho do gênero *Salinispora*, onde evidenciou uma alta taxa de diversidade de vias biosintéticas presentes. Nesse trabalho, os autores denominaram de Unidades Biosintéticas Operacionais (UBO) as sequências gênicas com conteúdo e organização similar a vias biosintéticas do grupo das PKSs ou NRPSs, com base em previsões quanto aos metabólitos secundários a serem produzidos. Os genomas de *S. arenicola* apresentaram 300Kb maior e possuem mais quatro UBOs que as espécies *S. pacifica* e *S. tropica*, entretanto os genomas das espécies de *S. pacifica* apresentaram 88 UBOs, sendo esta consideravelmente mais diversa que as espécies *S. arenicola* e *S. Tropica*, com 47 e 19 UBOs respectivamente. Entre as três espécies estudadas, foram identificadas um total de 124 vias de biosintéticas e outras 229 vias foram preditas, porém apenas 9 UBOs foram efetivamente relacionadas a produção de metabólitos secundários já conhecidos.

Ainda para este mesmo estudo, os autores evidenciam que, baseado em estudos anteriores com métodos de cultivo, os padrões de produção de metabolitos secundários e distribuições de genes em *S. arenicola* e *S. tropica* são espécie-especificos e que as UBOs apresentam correlação com as espécies e não com a região coletada, indicando a importância da taxonomia sobre a origem biogeográfica em termos de distribuições das OBUs neste gênero microbiano.

Na raro, Ziemert e colaboradores (2014) encontraram vias biosintéticas que ocorriam em apenas uma linhagem dentro de uma dada espécie, ou seja, há uma grande variação, a nível subespecífico, quanto aos metabólitos que podem ser produzidos. Os autores atribuíram que a transferência horizontal recente é a responsável pela maioria das vias que ocorrem apenas em uma ou duas linhagens, onde as vias adquiridas são incorporadas em ilhas genômicas e são comumente trocadas dentro e entre as espécies. Entretanto, apesar da extensa transferência horizontal dos genes entre esses actinomicetos existem claras evidências que há uma

herança vertical em nível de espécie apoiando o conceito de que metabólitos secundários representam características funcionais que ajudam a definir espécies do gênero *Salinispora*. A plasticidade do metaboloma secundário do gênero *Salinispora* fornece um mecanismo eficaz para maximizar a diversidade de metabólitos secundários enquanto limita o número de vias mantidas dentro de qualquer genoma individual.

Os extratos obtidos das cepas de *Salinispora* analisadas no presente trabalho apresentaram citotoxicidade diferente, com  $CI_{50}$  variando entre 16,06 e 0,07  $\mu\text{g/mL}$ . Essa variação da atividade biológica entre os extratos pode estar relacionada à variabilidade das respectivas composições químicas, sejam qualitativas (alguns compostos presentes em uns extratos e ausente em outros) ou quantitativas (compostos que possam estar ocorrendo em maiores quantidades em alguns extratos e em menores em outros). Essa variação é amparada pelos resultados obtidos por Ziemert e colaboradores (2014), que encontrou uma ampla variedade entre as vias relacionadas ao metabolismo secundário entre espécies de *Salinispora* e, inclusive, a nível subespecífico.

A segunda bactéria estudada foi a BRA-199, selecionada a partir dos resultados promissores de citotoxicidade apresentados pelos extratos acetato ( $CI_{50} = 0,04 \mu\text{g/mL}$ ), n-butanol ( $CI_{50} = 0,18 \mu\text{g/mL}$ ) e metanol ( $CI_{50} = 1,49 \mu\text{g/mL}$ ) obtidos do seu caldo microbiano, além da composição química peculiar apresentada pelos mesmos na análise por desreplcação. A cepa BRA-199 foi identificada como pertencente ao gênero *Streptomyces* através de análise filogenética do gene rRNA 16S, agrupando-se proximamente num clado formado pelas espécies *S. sparsogenes*, *S. bingchenggens*, *S. ferralitis*, *S. abikoensis* e *S. wuyuanensis*.

*Streptomyces* são bactérias aeróbias e gram-positivas do solo pertencente à família *Actinobactérias* que apresentam um crescimento filamentososo a partir de um único esporo. À medida que seus filamentos crescem através de extensão das pontas e ramificações, acabam por formar uma rede de filamentos ramificados chamados micélio vegetativo (Dyson, 2011). Quando submetidos a estresses ambientais, por exemplo, a limitação de nutrientes, e com a condição de cultivo sólido, os membros desse grupo passam da fase vegetativa (isto é, micélio vegetativo) para uma fase de esporulação reprodutiva na forma de micélio aéreo multinucleado (HWANG et al., 2014).

O gênero *Streptomyces* é bastante diversificado possuindo mais de 500 espécies em seu grupo e representa cerca de 10-28% das bactérias presentes no solo. Apesar de este grupo ser abundante em solos, existem estudos relatando sua ampla ocorrência em águas de lago e o isolamento de membros do grupo provenientes do ambiente marinho, desde zonas costeiras marinhas a sedimentos de mar profundo. Entretanto a ocorrência, distribuição e ecologia em outros ambientes, como os ecossistemas aquáticos não são tão bem conhecidas (BARTON E NORTHRUP, 2011; MINCER et al, 2002; JENSEN et al, 1991; RHEINHEIMER, 1992).

*Streptomyces* são reconhecidos pela sua extraordinária capacidade de produção de metabólitos secundários, tais como pigmentos, agentes antibióticos e antitumorais, além de inseticidas (MADIGAN et al., 2000).

Os extrato da cepa BRA-199 mostrou uma composição química diferente, incluindo a presença da piericidina A (**3**) e compostos relacionados (**4** e **8**) como metabolitos principais. O fracionamento do extrato bruto rendeu 7 frações, as quais destacaram-se as frações BRA-199B, BRA-199C, BRA-199D e BRA-199E por apresentarem inibição da proliferação celular da linhagem de célula tumoral de adenocarcinoma de cólon humano (HCT-116) *in vitro*, apresentando valores inibitórios acima de 80% nas concentrações de 5 e 50 µg/mL, com exceção da fração BRA-199E que inibiu apenas na maior dose testada. O fracionamento bioguiado das frações acima citadas levou ao isolamento dos compostos piericidina A (**3**) e glicopiericidina A (**8**) obtidos das frações BRA-199B5(2) e BRA-199C, respectivamente.

Piericidina A teve sua estrutura elucidada e atividade inseticida reportada pela primeira vez por Takahashi em 1965. A molécula apresenta estrutura bastante similar à coenzima Q (CoeQ; ubiquinona), tendo em sua cadeia um anel aromático piridiníco ligado por dois grupos metoxilas adjacentes, uma metila e uma hidroxila ligada ao anel piridina e uma cadeia lateral isoprenóide (HALL, WU e CRANE, 1966).

A Coenzima Q atua na transdução energética do processo de respiração celular da cadeia respiratória mitocondrial. A similaridade existente entre as moléculas de piericidina A e coenzima Q causa a competição pelo mesmo sitio de ligação bloqueando a atividade do complexo I da cadeia transportadora de elétrons. A molécula de piericidina A atua na inibição da enzima NADH desidrogenase, bloqueando a oxidação do NADH, tendo seu mecanismo de ação relacionado com a interferência no transporte de elétrons através da membrana interna da mitocôndria

de células animais (TAKAHASHI e TAMURA, 1966; YOSHIDA, SHIRAISHI e TAKAHASHI, 1977).

Apesar de a piericidina A ser descrita como um potente inseticida, vários estudos tem demonstrado que a molécula apresenta também potente atividade citotóxica contra diversas linhagens de células tumorais, exibindo também atividades antibacteriana, antifúngica e atuando como inibidores de proteínas da resposta imune (SURUP et al., 2008). Os estudos de citotoxicidade referentes à piericidina A tem mostrado que o composto apresenta inibição da proliferação celular em concentrações médias inibitórias da ordem de grandeza de nanomolar (KITAGAWA et al., 2010; SINGH et al., 2013).

O fracionamento das subfrações BRA-199E1 e BRA-199E2 resultaram no isolamento das dicetopiperazinas (dipeptídeos cíclicos) identificadas com base em suas HRESIMS e dados de EM/EM. Os espectros de  $^1\text{H}$  NMR foram importantes para confirmar as estruturas, bem como para definir a estereoquímica dos centros estereogénicos. O MS/MS dos compostos **13** e **14** apresentou íons de  $m/z$  233,1271, 217,1211 (-CO),  $m/z$  170,0906 e 154,0974 (-Ph) e  $m/z$  120,0847 e 120,0881 relacionada com a eliminação de  $\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_3$  e  $\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_2$  para os compostos **13** e **14**, respectivamente. Da mesma forma, o íon de massa  $m/z$  130,0696, compatível com a estrutura do composto **15**.

Dicetopiperazinas são ubíquas na natureza e frequentemente isoladas tanto de organismos terrestres como marinhos. Estes compostos são muito comuns em fungos, particularmente em espécies do género *Penicillium*, eles estão presentes em vários microrganismos marinhos, esponjas e a partir de uma variedade de tecidos e fluidos corporais. Em geral, estes compostos mostraram ter propriedades antimicrobianas, antimutagénicas e antitumorais.

Os microrganismos são reconhecidos pela sua capacidade de produzir dicetopiperazinas; sendo estes compostos produzidos por cerca de 90% da bactérias Gram negativas e de bactérias Gram positivas. Além dos microrganismos, fungos, algas verdes, algas marrons, algas vermelhas, esponjas, cnidários, briozoários, moluscos, tunicados, equinodermos e plantas de mangue verdadeiros tem sido reportados como produtores (HUANG et al., 2010; BLUNT, et al., 2009; FENICAL, 1993).

As dicetopiperazinas podem ser produzidas pela degradação de oligopeptídeos e biossíntese por aminoácidos dos organismos. Estes compostos são de grande interesse para os estudos farmacológicos por causa de sua notável bioatividade, tais como antimicrobiana, antitumoral, antiviral, antifúngica, antihiperglicêmica, afinidade por canais de cálcio e diversos receptores adrenérgicos, além de promotor do crescimento de plantas. (HUANG et al., 2010; DINSMORE e BESHORE, 2002; MARTINS e CARVALHO, 2007).

A caracterização da fração BRA-199E1 permitiu o isolamento da dicetopiperazina Ciclo-(Fenil-trans-4-Hidroxi-Prolina) (**13**) o qual apresentou o pico de massa protonada  $m/z$  261,1227. O isolamento do Ciclo-(Fenil-trans-4-Hidroxi-Prolina) foi anteriormente isolado do extrato obtido da esponja marinha da espécie *Jaspis digonoxea* (RUDI et al., 1994).

Um estudo posterior isolou uma cepa microrganismo marinho denominada de A108 a partir de tecidos do zoantídeo *Palythoa* sp.. O estudo realizou o fracionamento bioguiado do caldo de fermentação da estirpe, que apresentou capacidade de promover o crescimento de plantas em telas. O fracionamento resultou no isolamento de três compostos com capacidade de estimular o crescimento das plantas, Ciclo [L-(4-hidroxi prolina)-L-leucina], Ciclo [L-(4-hidroxi prolina)-D-leucina] e Ciclo [L-(4-hidroxi prolina) -L-fenilalanina] (CRONAN et al., 1998).

Furtado e colaboradores reportaram a presença do composto (**13**) no extrato obtido da cultura do fungo *Aspergillus fumigatus*, recuperado do solo do pantanal (FURTADO et al., 2005). Além deste outros três estudos relatam o isolamento da dicetopiperazina Ciclo-(Fenil-trans-4-Hidroxi-Prolina) a partir de bactérias recuperadas do ambiente marinho, entre estas uma cepa de *Psychrobacter* sp. associada à esponja marinha da espécie *Stelletta* sp (HUAYUE et al., 2008; ROSA, MITO e TOMMONARO, 2003; JIANG et al., 2000).

Estudos tem descrito o composto **13** atuando no processo de sinalização do “*quorum sensing*” bacteriano, sugerindo até que a molécula represente uma nova classe de mediadores da sinalização (HUAYUE et al., 2008; ROSA, MITO e TOMMONARO, 2003; JIANG et al., 2000). Jiang e colaboradores 2000 relatam que a molécula **13** não apresenta atividade antimicrobiana, entretanto observaram que o composto estimulou a cepa de *Pseudoalteromonas luteoviolacea* a produzir extratos com atividade antimicrobiana.

Os compostos **13** e **14** foram identificados em frações ativas obtidas do extrato obtido da cultura de *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393, ambos descritos pela primeira vez em bactérias do ácido láctico/bactérias lácticas. As estruturas foram determinadas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear, espectrometria de massa e cromatografia gasosa (STRÖM et al., 2002).

A prospecção de novas moléculas com atividade antibacteriana realizada por Jayatilake e colaboradores 1996 isolou o composto **14** de uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* associada a uma esponja marinha do Antártico. Além disso, o composto é descrito por ser produzido pelo fungo fitopatogênico da espécie *Alternaria alternata* juntamente com uma série de outras dicetopiperazinas que possuem prolina na sua estrutura (STIERLE, CARDELLINA & STROBEL, 1988b).

A dicetopiperazina (**14**) foi isolada do sobrenadante de cultura livres de células a partir de cepas de *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas alcaligenes*.

Holden e colaboradores 1999 descrevem que a Ciclo-(Fenilalanina-Prolina) pode estar envolvida no mecanismo de *quorum sensing*, que sincroniza as respostas fisiológicas bacterianas de forma dependente da densidade celular.

O extrato da cepa denominada de BRA-177 apresentou intensa atividade citotóxica com valor de  $CI_{50}$  igual a 4,09  $\mu\text{g/mL}$ , entretanto sua atividade ficou mais pronunciada após seu crescimento em larga escala no meio de cultura A1 suplementado o extrato acetato da cepa BRA-177 apresentou um aumento no seu potencial citotóxico com  $CI_{50}$  de 0,13  $\mu\text{g/mL}$ .

A identificação taxonômica pela análise filogenética do gene RNAr 16S extraído da estirpe BRA-177 revelou uma semelhança em pares mais proximamente com a espécie *Actinomadura madurae*.

O gênero *Actinomadura* foi reportado pela primeira vez por Vicent que isolou e descreveu o agente causador do micetoma denominado de “doença do pé maduro” em 1894, chegando a ser estabelecido apenas em 1970 por Lechevalier e Lechevalier (GOODFELLOW, 1989). O esclarecimento da taxonomia do gênero é resultado do uso de uma abordagem polifásica em taxonomia bacteriana e, em particular, análise da seqüência do gene RNAr 16S. O gênero *Actinomadura* pertence à família *Thermomonosporaceae*, que também inclui os gêneros *Actinocorallia*, *Spirillospora* e *Thermomonospora* (TRUJILLO & GOODFELLOW, 2003; ZHANG, WANG & RUAN,

1998;).

As espécies deste grupo formam micélio vegetativo ramificado estável e possuem meso-2, 6 - ácido diaminopimélico sem possuir arabinose e galactose em sua parede celular. O gênero *Actinomadura* compreende 34 espécies reconhecidas e duas subespécies, entre elas a espécie *Actinomadura madurae* (EUZE'BY, 2006; QUINTANA, TRUJILLO & GOODFELLOW, 2003; LECHEVALIER & LECHEVALIER, 1970).

O fracionamento do extrato orgânico da BRA-177 rendeu 6 frações com atividade citotóxica variando entre 0,08 µg/mL (BRA-177H) a 9,07 µg/mL (BRA-177J). A análise por CL-MS das frações ativas mostrou os íons de massa  $m/z$  364,2294 e  $m/z$  366,2453, identificados como sendo os compostos ciclonilprodigiosina (**16**) e nonilprodigiosina (**17**) respectivamente.

Prodigiosinas são típicos alcaloides de pigmentação vermelha que apresentam uma estrutura básica formada por três anéis pirrolicos e um esqueleto pirrolidipirometano com um grupo C-4-metoxi (Bennett & Bentley, 2000). O primeiro membro da família de prodigiosinas foi isolado por Gerber, 1969, do microrganismo *Bacillus prodigiosus*, desde então outros compostos dessa família foram isolados de espécies dos gêneros: *Serratia*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Pseudoalteromonas* e *Actinomadura* (ARTHAUD et al., 2012; GIRI et al., 2004).

As prodigiosinas são tipicamente produzidas como metabólitos secundários dos microrganismos e vários compostos dessa família tais como undecilprodigiosina, metacicloprodigiosina, roseofilina e nonilprodigiosina, além de prodigiosina apresentam propriedades farmacológicas bastante relevantes como antibacteriana, antimalária, anticancerígena, citotóxica e atividade imunossupressora (MONTANER & PÉREZ-TOMÁS, 2001; MONTANER, et al., 2000; HAN, et al., 1998).

Gerber, em 1969, realizou a fermentação de 13 estirpes de *A. pelletieri* e 3 cepas de *A. madurae*, onde pode observar que todos os extratos obtidos do fermentado dos microrganismos apresentavam em sua composição pigmentos do tipo prodigiosina. Gerber detectou por técnicas de massa e ressonância magnética nuclear que o principal composto presente no extrato da estirpe de *A. madurae* 953 era a nonilprodigiosina, vindo posteriormente isolar da mesma espécie a ciclonilprodigiosina. Os extratos obtidos da estirpe de *A. pelletieri* apresentaram uma estrutura química distintamente diferente da metacicloprodigiosina, sendo

denominada posteriormente de prodiginina (GERBER, 1973; GERBER, 1969).

Os resultados apresentados por Gerber (1969) reforçam o resultado de identificação filogenética apresentada para a cepa BRA-177 isolada do sedimento marinho do ASPSP.

Em 2012, Arthaud e colaboradores isolaram o composto prodigiosina do extrato acetato de etila da cepa BRA-007 recuperada do sedimento marinho coletado na praia da Taíba, Ceará, posteriormente identificada como sendo da espécie *Pseudoaeromonas sp.*. A prodigiosina obtida do extrato orgânico da cultura de *Pseudoaeromonas* apresentou potente atividade citotóxica contra as linhagens de célula tumoral. Os valores de  $CI_{50}$  obtidos para prodigiosina foi de 0,05  $\mu\text{g/mL}$  para linhagem de leucemia mielocítica, 0,19  $\mu\text{g/mL}$  na linhagem de melanoma (MDA-MB-435) e 0,06  $\mu\text{g/mL}$  para as linhagens de carcinoma de cólon (HCT-8) e glioblastoma (SF-295).

Ainda para este estudo, Arthaud e colaboradores (2012) observaram que o composto prodigiosina quando testada em células transfectadas com moderada e alta expressa de ErbB-2 apresentava atividade 100 e 18 vezes maior, respectivamente, quando comparadas a citotoxicidade contra a linhagem normal de HB4a.

O presente trabalho mostra que o Arquipélago São Pedro e São Paulo apresenta sedimentos com uma riqueza relativamente baixa para a comunidade microbiana encontrada para os grupos Bacteria e Archaea, com pequena similaridade entre os períodos de coleta. Através da caracterização química dos extratos obtidos das culturas dos actinomicetos recuperados das amostras de sedimento foi possível identificar compostos com potencial antimicrobiano e citotóxico. Os microrganismos cultiváveis associados aos sedimentos circunjacentes ao ASPSP são promissoras fontes de compostos com propriedades farmacológicas.

## 6. CONCLUSÃO

A comunidade microbiana associada ao sedimento marinho do arquipélago de São Pedro e São Paulo, apesar da relativamente baixa riqueza biológica para os grupos microbianos de Bacteria e Archaea, apresenta uma alta diversidade química entre os metabólitos secundários produzidos pelos actinomicetos cultiváveis dali recuperados. Neste contexto, esta região é uma promissora fonte para prospecção de novos compostos com atividade biológica. Vale ressaltar que este é o primeiro registro da ocorrência de actinomicetos do gênero *Salinispora* em sedimento marinho do território brasileiro, sendo este um gênero microbiano de grande destaque atualmente devido a sua relevância farmacológica. Mais além, os resultados aqui apresentados sedimentam a importância dos microrganismos associados ao sedimento marinho como fonte de moléculas bioativas com potencial citotóxico, sendo este um trabalho pioneiro que visa conhecer o potencial biotecnológico de microrganismos recuperados do sedimento do ASPSP.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No decorrer deste trabalho de tese ficou evidenciado a importância dos estudos de ecologia microbiana e dos estudos de prospecção biotecnológica, química e farmacológica dos microrganismos cultiváveis recuperados dos sedimentos coletados na ilha do arquipélago São Pedro e São Paulo. Vale ressaltar ainda, que este trabalho foi pioneiro para os estudos de prospecção biotecnológica para esta área, sendo este um estudo mais amplo e horizontal que gerou uma ampla variedade de resultados. Os resultados apresentados quanto ao tipo de solvente utilizado para a extração dos caldos microbianos demonstraram mais eficaz para os extratos obtidos pela extração com acetato de etila, validando a sua utilização para mudanças no protocolo de extração, assim como a aplicação da cromatografia funcional para a caracterização dos extratos e identificação de compostos promissores de um modo rápido e preciso. Os resultados obtidos através da aplicação deste trabalho de tese demonstraram ainda a importância da comunidade microbiana associada ao sedimento das áreas circunjacentes ao ASPSP como fonte de novos potenciais fármacos com potencial antimicrobiano e anticâncer. Os resultados alcançados neste trabalho possibilitou novos projetos de prospecção biotecnológica englobando as diversas ilhas insulares da costa do Brasil e invertebrados marinhos, novos trabalhos de tese foram propiciados pelo uso dos dados e microrganismos isolados das amostras e a publicação de diversos trabalhos.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABSALON, M.J.; SMITH, F.O.; Treatment strategies for pediatric acute myeloid leukemia. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. **2009**, 10, 57-79.

ALKATIB, A. M.; SMITH, M. R.; KAMANDA, W. S.; PETTIT, G. R.; HAMDAN, M.; MOHAMED, A. N.; CHELLADURAI, B.; MOHAMMAD, R. M.; Bryostatin 1 down-regulates mdr1 and potentiates vincristine cytotoxicity in diffuse large cell lymphoma xenografts. *Clinical Cancer Research*. **1998**, 4 (5), 1305-1314.

AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H.; Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*. 1995, 59, 143-169.

ANDRÉO, M. A.; JIMENEZ, P. C.; SIEBRA, J. B. C. N.; COSTA-LOTUFO, L. V.; VESSECCHI, R.; NIEHUES, M.; LOPES, J. C. C.; LOPES, N. P. Systematic UPLC-ESI-MS/MS Study on the Occurrence of Staurosporine and Derivatives in Associated Marine Microorganisms from *Eudistoma vannamei*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. **2012**, 23, 335–343.

ARTHAUD, I.D.; RODRIGUES, F.A.; JIMENEZ, P.C.; MONTENEGRO, R.C.; ANGELIM, A.L.; MACIEL, V.M.; SILVEIRA, E.R.; FREITAS, H.P.; SOUSA, T.S.; PESSOA, O.D.; LOTUFO, T.M.; COSTA-LOTUFO, L.V.; Studies on the secondary metabolites of a *Pseudoalteromonas* sp. isolated from sediments collected at the northeastern coast of Brazil. *Chemistry & Biodiversity*. **2012**, 9 (2):418-427.

BARTON, L.L.; & NORTHRUP, D.E.; *Microbial Ecology*. 1st Edn. John Wiley and Sons, Oxford, ISBN-10: 1118015835, **2011**, pp: 360.

BENNETT, J.W. & BENTLEY, R.; Seeing red: the story of prodigiosin. *Advances in Applied Microbiology*. **2000**, 47, 1-32.

BÉRDY, J.; Bioactive microbial metabolites. *The Journal of Antibiotics*. **2005**, 58, 1–26.

BÉRDY, J.; Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. *The Journal of Antibiotics*. **2012**, 65 (8), 385-395.

BERGMANN, W. & BURKE, D. C. Contributions to the study of marine products. XL. The nucleosides of sponges. IV. Spongosine. *The Journal of Organic Chemistry*. **1956**, 22, 226-228.

BERGMANN, W. & FEENEY R. J. Contributions to the study of marine products. XXXII. The nucleosides of sponges. I. *The Journal of Organic Chemistry*. **1951**, 16, 981-987.

BERGMANN, W. & STEMPIEN, M. F. Contributions to the study of marine products. XLIII. The nucleosides of sponges. V. The synthesis of spongosine. *The Journal of Organic Chemistry*. **1957**, 22, 1575-1557.

BHAKUNI, DEWAN S. & RAWAT, D.S.; Bioactive Marine Natural Products. *Nova Dehli: Anamaya Publishers*. **2005**, 397p.

BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; HU, WAN-PING.; MUNRO, M.H.G.; NORTHCOLE, P.T.; PRINSEP, M.R.; Marine natural products. *Natural Product Reports*. **2009**, 26, 170-244.

BOWERSOX, S.S. & LUTHER, R.; Pharmacotherapeutic potential of omega- conotoxin MVIIA (SNX-111), an N-type neuronal calcium channel blocker found in the venom of *Conus magus*. *Toxicon*. **1998**, 36 (11), 1651-1658.

BOWMAN, J.P.; REA, S.M.; MCCAMMON, S.A.; MCMEEKIN, T.A.; Diversity and community structure within anoxic sediment from marine salinity meromictic lakes and a coastal meromictic marine basin, Vestfold Hils, Eastern Antarctica. *Environmental Microbiology*. **2000**, 2, 227-237.

BREDHOLDT, H.; GALATENKO, O.A.; ENGELHARDT, K.; FJAERVIK, E.; TEREKHOVA, L.P.; S. B. ZOTCHEV, S.B.; Rare actinomycete bacteria from the shallow water sediments of the Trondheim fjord, Norway: isolation,

diversity and biological activity. *Environmental Microbiology*. **2007**, 9 (11), 2756-2764.

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

CAPON, R. J.; STEWART, M.; RATNAYAKE, R.; LACEY, E.; GILL, J. H. Citromycetins and bilains A-C: new aromatic polyketides and diketopiperazines from Australian marine-derived and terrestrial *Penicillium* spp. *Journal of Natural Products*. **2007**, 70, 1746-52.

CAPON, R.J. Marine bioprospecting—Trawling for treasure and pleasure. *European Journal of Organic Chemistry*. **2001**, 4, 633-645.

CASTILLO, U.; MYERA, S.; BROWN, L.; STROBEL, G.; HESS, W.M.; J. HANKS, J.; Scanning electron microscopy of some endophytic Streptomycetes in snakevine-Kennedia nigricans. *Scanning*. **2005**, 27, 305-311.

CHEN, X.; SOMA, L.A. & FROMM, J.R.; Targeted therapy for Hodgkin lymphoma and systemic anaplastic large cell lymphoma: focus on brentuximab vedotin. *Journal of OncoTargets and Therapy*. **2014**, 7, 45-56.

COLQUHOUN, J.A.; HEALD, S.C.; LI, L.; TAMAOKA, J.; KATO, C.; HORIKOSHI, K.; BULL, A.T.; Taxonomy and biotransformation activities of some deep-sea actinomycetes. *Extremophiles*. **1998**, 2, 269–277.

COSTA-LOTUFO, L.V.; WILKE, D.V.; JIMENEZ, P.C.; EPIFÂNIO, R.A.; Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: histórico & perspectivas. *Quimica Nova*, **2009**, 32 (3), 703-716.

CRONAN, J.M.; DAVIDSON, T.R.; SINGLETON, F.L.; COLWELL, R.R.; CARDELLINA, J.H.; Plant growth promoters isolated from a marine bacterium associated with *Palythoa* sp. *Natural Product Letters* . **1998**, 11, 271-278.

DAIRI, T.; HAMANO, Y.; FURUMAI, T.; OKI, T.; Development of a self-cloning system for *Actinomadura verrucosospora* and identification of polyketide synthase genes essential for production of the angucyclic antibiotic pradimicin. *Applied and Environmental Microbiology*. **1999**, 65: 2703–2709.

DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*. **2012**, 9, 772.

DAS, S.; LYLA, P.S.; KHAN, S.A.; Distribution and generic composition of culturable marine actinomycetes from the sediments of Indian continental slope of Bay of Bengal. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*. **2008**, 26 (2), 166-177.

DHARMARAJ, S.; Marine Streptomyces as a novel source of bioactive substances. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **2010**, 26 (12), 2123-2139.

DIAS, D.A.; URBAN, S.; ROESSNER, U.; A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*. **2012**, 2, 303-336.

DINSMORE, C.J. & BESHORE, D.C.; Recent advances in the synthesis of diketopiperazines. *Tetrahedron*. 2002, 58 (17), 3297-3312.

DORONINA, S.O.; TOKI, B.E.; TORGOV, M.Y.; MENDELSON, B.A.; CERVENY, C.G.; CHACE, D.F.; DEBLANC, R.L.; GEARING, R.P.; BOVEE, T.D.; SIEGALL, C.B.; FRANCISCO, J.A.; WAHL, A.F.; MEYER, D.L.; SENTER, P.D.; Development of potent monoclonal antibody auristatin conjugates for cancer therapy. *Nature Biotechnology*. **2003**, 21, 778– 784.

DOWLATI, A.; LAZARUS, H. M.; HARTMAN, P.; JACOBBERGER, J. W.; WHITACRE, C.; GERSON, S. L.; KSENICH, P.; COOPER, B. W.; GOTTLIEB, M.; MURGO, A. J.; Phase I and Correlative Study of Combination Bryostatin 1 and Vincristine in Relapsed B-Cell Malignancies. *Clinical Cancer Research*. **2003**, 9 (16), 5929-5935.

Dyson, P.; *Streptomyces: Molecular Biology and Biotechnology*. *Horizon Scientific Press*, 1904455778, 9781904455776, **2011**, pp. 257.

ERBA, E.; BERGAMASCHI, D.; BASSANO, L.; DAMIA, G.; RONZONI, S.; FAIRCLOTH, G.T.; D'INCALCI, M.; Ecteinascidin-743 (ET-743), a natural marine compound, with a unique mechanism of action. *European Journal of Cancer*. **2001**, 37, 97–105.

EUZEBY, J. P.; List of prokaryotic names with standing in nomenclature. **2006**, <http://www.bacterio.cict.fr/>

EUZEBY, J.P.; List of bacterial names with standing in nomenclature genus *Actinomadura* [online]. **2010**, Available from <http://www.bacterio.cict.fr./a/actinomadura.html>.

FARROW, B.; THOMAS, R. P.; WANG, X. F.; EVERS, B. M.; Activation of conventional PKC isoforms increases expression of the pro-apoptotic protein bad and trail receptors. *International Journal of Gastrointestinal Cancer*. **2002**, 32 (2-3), 63-72

FDA approves brentuximab vedotin for Hodgkin lymphoma and systemic anaplastic large-cell lymphoma, *Oncology*. **2011**, 25, 904.

FENICAL, W.; New pharmaceuticals from marine organisms. *Trends in Biotechnology*. **1997**, 15 (9), 339-41.

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

FENICAL, W.; & JENSEN, P.R.; Marine Microorganisms: A New Biomedical Resource. *Marine Biotechnology*. **1993**, 1, Pharmaceutical and Bioactive Natural Products. 1 (Attaway DH, Zaborsky OR, Eds.): 419-459.

FENICAL, W.; BADEN, D.; BURG, M.; DE GOYET, C.V.; GRIMES, J.D.; KATZ, M.; Marine-derived pharmaceuticals and related bioactive compounds. In *From Monsoons to Microbes: Understanding the Ocean's Role in Human Health*. Fenical, W. (ed.). Washington, DC: National

Academies Press, 1999, 71–86.

FENICAL, W.; Marine Pharmaceuticals: Past, Present, and Future. *Oceanography*, **2006**, 19 (2), 110-119.

FRANCISCO, J.A.; CERVENY, C.G.; MEYER, D.L.; B.J. MIXAN, B.J.; KLUSSMAN, K.; CHACE, D.F.; REJNIAK, S.X.; GORDON, K.A.; DEBLANC, R.; TOKI, B.E.; LAW, C.L.; DORONINA, S.O.; SIEGALL, C.B.; P.D. SENTER, P.D.; WAHL, A.F.; cAC10-vcMMAE, an anti-CD30-monomethyl auristatin E conjugate with potent and selective antitumor activity, *Blood*. **2003**, 102 (4), 1458-1465.

FREEL, K.C.; EDLUND, A.; JENSEN, P.R.; Microdiversity and evidence for high dispersal rates in the marine actinomycete 'Salinispora pacifica'. *Environmental Microbiology*. **2012**, 14 (2), 480-93.

FURTADO, N. A. J. C.; VESSECCHI, R.; TOMAZ, C.; GALEMBECK, S. E.; BASTOS, J. K.; LOPES, N. P.; CROTTI, A. E. M. Fragmentation of diketopiperazines from *Aspergillus fumigatus* by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). *Journal of Mass Spectrometry*. 2007, 42, 1279–1286.

FURTADO, N.A.J.C.; PUPO, M.T.; CARVALHO, I.; CAMPO, V.L.; DUARTEII, M.C.T.; BASTOS, J.K.; Diketopiperazines produced by an *Aspergillus fumigatus* Brazilian strain. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. **2005**, 16 (6b).

GERBER, N.N.; Minor prodiginine pigments from *actinomadura madurae* and *actinomadura pelletieri*. *Journal of Heterocyclic Chemistry*. **1973**, 10 (6), 925-929.

GERBER, N.N.; Prodigiosin -like Pigments from *Actinomadura* (*Nocardia*) *Pelletieri* and *Actinomadura madurae*. *Applied Microbiology*. **1969**, 18 (1), 1-3.

GERWICK, W.H.; & MOORE, B.S.; Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology.

*Chemistry & Biology*. **2012**, 19 (1), 85-98.

GHAI, R.; MCMAHON, K.D.; RODRIGUEZ-VALERA, F.; Breaking a paradigm: cosmopolitan and abundant freshwater actinobacteria are low GC. *Environmental Microbiology Rep*. **2012**, 4 (1), 29-35.

Giri, A.V.; Anandkumar, N.; Muthukumaran, G.; Pennathur, G.; A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil. *BMC Microbiology*. **2004**, 4, 11.

GOODFELLOW, M. & FIEDLER, H.P.; A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **2010**, 98 (2), 119-42.

GOODFELLOW, M. & O'DONNELL, A.G.; Roots of bacterial systematic. In: The handbook of new bacterial systematic. London: Academic Press; **1994**. 3-54.

GOODFELLOW, M. 1971. Numerical taxonomy of some nocardioform bacteria. *Journal of General Microbiology*. **1971**, 69, 33-80.

GOODFELLOW, M.; & WILLIAMS, S.T.; Ecology of actinomycetes. *Annual Review of Microbiology*. **1983**, 37, 189-216.

GOODFELLOW, M.; Maduromycetes. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Edited by S. T. Williams, M. E. Sharpe & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins. **1989**, 4, 2509-2551.

HALL, C.; WU, M.; CRANE, F.L.; Piericidin A: a new inhibitor of mitochondrial electron transport. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **1966**, 25 (4), 373-377.

HAMEŞ-KOCABAŞ, E.E.; UZEL, A. Isolation strategies of marine-derived actinomycetes from sponge and sediment samples. *Journal of Microbiological Methods*. **2012**, 88, 342-347.

HAN, S.B.; KIM, H.M.; KIM, Y.H.; LEE, C.W.; JANG, E.S.; SON, K.H.; KIM,

S.U.; KIM, Y.K.; T-cell specific immunosuppression by prodigiosin isolated from *Serratia marcescens*. *International Journal of Immunopharmacology*. **1998**, 20, 1-13.

HANN, M.; Description of seven candidate species affiliated with the phylum Actinobacteria, representing planktonic freshwater bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **2009**, 59 (1), 112-117.

HAYAKAWA, M.; Studies on the isolation and distribution of rare actinomycetes in soil. *Actinomycetologia*. **2008**, 22 (1), 12-19.

HESTER, R.E.; HARRISON, R.M.; BIGG, G.R.; The Oceans and Climate. Chemistry in the Marine Environment; *The Royal Society of Chemistry*. **2000**, 13, 13-32.

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

HOLDEN, M.T.G.; CHHABRA, S.R., DE NYS, R.; STEAD, P.; BAINTON, N.J.; HILL, P.J.; MANEFIELD, M.; KUMAR, N.; LABATTE, M.; ENGLAND, D.; RICE, S.; GIVSKOV, M.; SALMOND, G.P.; STEWART, G.S.; BYCROFT, B.W.; KJELLEBERG, S.; WILLIAMS, P.; Quorum-sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria. *Molecular Microbiology*. **1999**, 33 (6), 1254-1266.

HUANG, R.; Zhou, X.; Xu, T.; Yang, X.; Liu, Y.; Diketopiperazines from Marine Organisms. *Chemistry & Biodiversity*. 2010, 7 (12), 2809-2829.

HUAYUE, L.; BYUNG-CHEOL, L.; TAE-SUNG; K.; KYUNG-SOOK; B.; JONG-KI; H.; SANG-HO; C.; BAOQUAN; B.; JEE-HYUNG, J.; Bioactive Cyclic Dipeptides from a Marine Sponge-Associated Bacterium, *Psychrobacter* sp. *Biomolecules & therapeutics*. **2008**, 16 (4), 356-363.

HWANG, K-S.; KIMA, H.U.; CHARUSANTIA, P.; PALSSONA, B.Ø.; LEE,

S.Y.; Systems biology and biotechnology of *Streptomyces* species for the production of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*. **2014**, 32 (2), 255-268.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2014. 124p.: il. col., mapas.

JACKSON, K.L.; HENDERSON, J.A.; PHILLIPS, A.J.; The Halichondrins and E7389. *Chem. Rev.* **2009**, 109, 3044–3079.

JAMES, E.M.; STACH, J.E.M.; MALDONADO, L.A.; WARD, A.C.; GOODFELLOW, M., BULL, A.T.; New primers for the class Actinobacteria: application to marine and terrestrial environments. *Environmental Microbiology*. 2003, 5 (10), 828-841.

JAYATILAKE, G.S.; THORNTON, M.P.; LEONARD, A.C.; GRIMWADE, J.E.; BAKER, B.J.; Metabolites from an Antarctic sponge-associated bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Natural Products*. **1996**, 59, 293-296.

JENSEN, P. R. et al. Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. *Environmental microbiology*. **2005**, 7 (7), 1039 - 1048.

JENSEN, P. R., R. DWIGHT, AND W. FENICAL. 1991. Distribution of actinomycetes in near-shore marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. **1991**, 57, 1102 –1108.

JENSEN, P.R. & LAURO, F.M. An assessment of actinobacterial diversity in the marine environment. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **2008**, 94, 51-62.

JENSEN, P.R. & MAFNAS, C.; Biogeography of the marine actinomycete. *Environmental Microbiology*. **2006**, 8, 1881-1888.

JENSEN, P.R.; MINCER, T.J.; WILLIAMS, P.G.; FENICAL, W.; Marine actinomycete diversity and natural product discovery. *Antonie van Leeuwenhoek*. **2005**, 87, 43-48.

JENSEN, P.R.; WILLIAMS, P.G.; DONG-CHAN OH, ZEIGLER, L.; FENICAL, W.; Species-Specific Secondary Metabolite Production in Marine Actinomycetes of the Genus *Salinispora*. *Applied and Environmental Microbiology*. **2007**, 73 (4), 1146-1152.

JIANG, Z.; BOYD, K.G.; MEARNS-SPRAGG, A.; ADAMS, D.R.; PHILLIP C. WRIGHT, P.C.; BURGESS, J.G.; Two Diketopiperazines and One Halogenated Phenol from Cultures of the Marine Bacterium *Pseudoalteromonas luteoviolacea*. *Natural Products Letter*. **2000**, 14 (6), 435-440.

JIMENEZ, J.T.; MÁRIA ŠTURDÍKOVÁ, M.; ŠTURDÍK, E.; Natural products of marine origin and their perspectives in the discovery of new anticancer drugs. *Acta Chimica Slovaca*. **2009**, 2 (2), 63-74.

JIMENEZ, P.C.; FERREIRA, E.G.; ARAÚJO, L.A.; GUIMARÃES, L.A.; SOUSA, T.S.; PESSOA, O.D.L.; LOTUFO, T.M.C.; COSTA-LOTUFO, L.V.; Cytotoxicity of actinomycetes associated with the ascidian *Eudistoma vannamei* (Millar, 1977), endemic of northeastern coast of Brazil. *Latin American Journal of Aquatic Research*. **2013**, 41 (2), 335-343.

JIMENEZ, P.C.; WILKE, D.V.; FERREIRA, E.G.; TAKEARA, R.; MORAES, M.O.; SILVEIRA, E.R.; LOTUFO, T.M.C.; LOPES, N.P.; COSTA-LOTUFO, L.V.; Structure Elucidation and Anticancer Activity of 7-Oxostaurosporine Derivatives from the Brazilian Endemic Tunicate *Eudistoma vannamei*. *Marine Drugs*. **2012**, 10, 1092-1102.

JIMENEZ, P.C.; WILKE, D.V.; TAKEARA, R.; LOTUFO, T.M.C.; PESSOA, C.; MORAES, LOPES, N.P.; COSTA-LOTUFO, L.V.; Cytotoxic activity of adichloromethane extract and fractions obtained from *Eudistoma vannamei* (Tunicata: Ascidiacea). *Comparative Biochemistry and Physiology*. **2008**, 151, 391-398.

JIMENO, J.; FAIRCLOTH, G.; FERNÁNDEZ SOUSA-FARO, J.M.; SCHEUER, P.; RINEHART, K.; New Marine Derived Anticancer Therapeutics – A Journey from the Sea to Clinical Trials. *Marine Drugs*. **2004**, 2, 14-29.

KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*. 2013, 30, 772–80.

KELLER M. AND ZENGLER K.; Tapping into microbial diversity. *Nature Rev. Microbiol.* **2004**, 2, 141-150.

KENNEDY, J.; O'LEARY, N.D.; KIRAN, G.S.; MORRISSEY, J.P.; O'GARA, F.; SELVIN, J.; DOBSON, A.D.W.; Functional metagenomic strategies for the discovery of novel enzymes and biosurfactants with biotechnological applications from marine ecosystems. *J. Appl. Microbiol.* **2011**, 111 (4), 787-799.

KIM, C.M.; LEC, K.H.; KWON, O.S.; SHIMAZU, A.; YOO, I.D.; Selective isolation of Actinomycetes by physical pre-treatment of soil sample. *Journal of Applied Environmental Microbial Biotechnology*. **1994**, 22, 222-225.

KÖCHLING, T.; LARA-MARTÍN, P.; GONZÁLEZ-MAZO, E.; AMILS, R.; SANZ, J.L.; Microbial community composition of anoxic marine sediments in the Bay of Cádiz (Spain). *International Microbiology*. 2011, 14 (3), 143-154.

LEAL, M.C.; MADEIRA, C.; BRANDÃO, C.A.; PUGA, J.; CALADO, R.; Bioprospecting of Marine Invertebrates for New Natural Products - A Chemical and Zoogeographical Perspective. *Molecules*. **2012**, 17(8), 9842-9854.

LEAL, M.C.; PUGA, J.; SERÓDIO, J.; GOMES, N.C.M.; CALADO, R.; Trends in the Discovery of New Marine Natural Products from Invertebrates over the Last Two Decades – Where and What Are We Bioprospecting? *Plos One*. **2012**, 7(1), e30580.

LECHEVALIER, H. A., AND M. P. LECHEVALIER. A critical evaluation of

the genera of aerobic actinomycetes, **1970**, p. 393-405. In H. Prauser (ed.), *The actinomycetales*. Gustav Fischer Verlag, Jena.

LECHEVALIER, M. P. & LECHEVALIER, H.A.; Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **1970**, 20, 435-444.

LI, J.W-H.; & VEDERAS, J.C.; Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? *Science*. **2009**, 325, 161-165.

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

MAGARVEY, N.A.; KELLER, J.M.; BERNAN, V.; DWORKIN, M.; SHERMAN, D.H.; Isolation and characterization of novel marine-derived actinomycete taxa rich in bioactive metabolites. *Applied and Environmental Microbiology*. **2004**, 70 (12), 7520- 7529.

MALDONADO, L. A; STACH, J. E. M.; PATHOM-AREE, W.; WARD, A. C.; BULL, A. T.; GOODFELLOW, M.; Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **2005**, 87, 11-18.

MALDONADO, L.A.; FENICAL, W.; JENSEN, P.R.; KAUFFMAN, C.A.; MINCER, T.J.; WARD, A.C.; BULL, A.T.; GOODFELLOW, M.; *Salinispora arenicola* gen. nov., sp. nov. and *Salinispora tropica* sp. nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family Micromonosporaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **2005**, 55 (5), 1759-1766.

MANIVASAGAN, P.; VENKATESAN, J.; SIVAKUMAR, K.; KIM, S.K.; Marine actinobacterial metabolites: current status and future perspectives. *Microbiological Research*. **2013**, 168 (6), 311-332.

MATSUDA, S.; ADACHI, K.; MATSUO, Y.; NUKINA, M.; SHIZURI, Y. *Salinisporamycin*, a novel metabolite from *Salinispora arenicola*. [corrected].

*The Journal of Antibiotics*. (Tokyo). **2009**, 62, 519-526.

MAYER, A.M.S.; GLASER, K.B.; CUEVAS, C.; JACOBS, R.S.; KEM, W.; LITTLE, R.D.; MCINTOSH, J.M.; NEWMAN, D.J.; POTTS, B.C.; SHUSTER, D.E.; The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. *Trends in Pharmacological Sciences*. **2010**, 31 (6), 255-265.

MCGIVERN, J.G.; Targeting N-type and T-type calcium channels for the treatment of pain. *Drug Discovery Today*. **2006**, 11, 245–253.

MENIS, J.; & TWELVES, C.; Eribulin (Halaven): a new, effective treatment for women with heavily pretreated metastatic breast cancer. *Journal of Breast Cancer: Targets and Therapy*. **2011**, 3, 101–111.

MILJANICH, G.P.; Ziconotide: neuronal calcium channel blocker for treating severe chronic pain. *Current Medicinal Chemistry*. **2004**, 11, 3029–3040.

MINCER, T. J., P. R. JENSEN, C. A. KAUFFMAN, AND FENICAL, W.; Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. **2002**, 68, 5005 - 5011.

MINICH, S.S.; Brentuximab vedotin: a new age in the treatment of Hodgkin lymphoma and anaplastic large cell lymphoma. *Annals of Pharmacotherapy*. **2012**, 46, 377 - 383.

MIYADOH S Research on antibiotic screening in Japan over the last decade: A producing microorganisms approach. *Actinomycetologica*. **1993**, 9, 100-106.

MONTANER, B.; NAVARRO, S.; PIQUÉ, M.; VILASECA, M.; MARTINELL, M.; GIRALT, E.; GIL, J.; PÉREZ-TOMÁS, R.; Prodigiosin from the supernatant of *Serratia marcescens* induces apoptosis in haematopoietic cancer cell lines. *British Journal of Pharmacology*. **2000**, 131, 585-593.

MONTANER, B.; PÉREZ-TOMÁS, R.; Prodigiosin-induced apoptosis in human colon cancer cells. *Life Sciences*. **2001**, 68, 2025-2036.

MORAN, M.A.; RUTHERFORD, L.T.; HODSON, R.E.; Evidence for indigenous *Streptomyces* populations in a marine environment determined with a 16S rRNA probe. *Applied and Environmental Microbiology*. **1995**, 61 (10), 3695–3700.

MOREIRA, A.P.B.; TONON, L.A.C.; PEREIRA, C.V.P.; ALVES JR., N.; AMADO-FILHO, G.M.; FRANCINI-FILHO, R.B.; PARANHOS, R.; THOMPSON, F.L.; Culturable Heterotrophic Bacteria Associated with Healthy and Bleached Scleractinian *Madracis decactis* and the Fireworm *Hermodice carunculata* from the Remote St. Peter and St. Paul Archipelago, Brazil. *Current Microbiology*. **2014**, 68 (1), 38-46.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. **1983**, 65, n. 1-2, p. 55–63.

MURPHY, B.T.; MALONEY, K.N.; FENICAL, W; Natural Products from Marine Microorganisms. In *Phytochemistry and Pharmacognosy*, **2009**, in Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS), Developed under the Auspices of the UNESCO. Oxford, UK: Eolss Publishers.

MUSAT, N.; WERNER, U.; KNITTEL, K.; KOLB, S.; DODENHOF, T.; VAN BEUSEKOM, J.E.; DE BEER, D.; DUBILIER, N.; AMANN, R.; Microbial community structure of sandy intertidal sediments in the North Sea, Sylt-Rømø Basin, Wadden Sea. *Systematic and Applied Microbiology*. **2006**, 29 (4), 333-348.

NEWMAN, D.J.; & CRAGG, G.M.; Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*. **2012**, 75 (3), 311-335.

NOVÁKOVÁ, J. & FARKAŠOVSKÝ, M.; Bioprospecting microbial metagenome for natural products. *Biologia*. **2013**, 68 (6), 1079-1086.

OKI, Y.; & YOUNES, A.; Brentuximab vedotin in systemic T-cell lymphoma, *Expert. Opin. Biol. Ther.* **2012**, 12, 623–632.

OLANO, C.; MÉNDEZ, C.; SALAS, J.A.; Antitumor Compounds from Marine Actinomycetes. *Mar. Drugs*. **2009**, 7 (2), 210-248.

OMURA, S.; IWAI, Y.; HIRANO, A.; NAKAGAWA, A.; AWAYA, J.; TSUCHYA, H.; TAKAHASHI, Y.; MASUMA, R.; A new alkaloid AM-2282 OF *Streptomyces* origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization. *Journal of Antibiotics*. **1977**, 30 (4):275-282.

ØVREÅS, L.; Forney, L.; Daae, F.L.; Torsvik, V.; Distribution of Bacterioplankton in Meromictic Lake Sælenvannet, as Determined by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified Gene Fragments Coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. **1997**, 63 (9), 3367–3373.

PELAEZ, F.; GENILLOUD, O.; Discovering new drugs from microbial natural products. In: Barredo, J.L., editor. *Microorganisms for Health Care, Food and Enzyme Production*. Research Signpost; Trivendrum, India: **2003**. pp. 1–23.

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

PETTIT, G. R.; DAY, J. F.; HARTWELL, J. L.; WOOD, H. B.; Antineoplastic Components of Marine Animals. *Nature*. **1970**, 227, 962-963.

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

PRAUSER, H. Host parasite relationships in nocardioform organisms, **1976**, p. 266-284 In M. Goodfellow, G. H. Brownell, and J. A. Serrano (ed.), *The biology of the nocardiae*. Academic Press Inc., London.

PRIETO-DAVÓ, A.; FENICAL, W.; JENSEN, P.; Comparative actinomycete diversity in marine sediments. *Aquatic Microbial Ecology*. **2008**, 52 (6), 1-11.

PROKSCH, P.; EDRADA, R.A., EBEL, R.; Drugs from the seas – current status and microbiological implications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **2002**, 59, 125–134.

PROMMER, E.E.; Ziconotide: Can we use it in palliative care? *American Journal of Hospice and Palliative Medicine*. **2005**, 22 (2), 369-374.

QUINTANA, E. T., TRUJILLO, M. E. & GOODFELLOW, M.; *Actinomadura mexicana* sp. nov. and *Actinomadura meyerii* sp. nov., two novel soil sporoactinomycetes. *Systematic and Applied Microbiology*. **2003**, 26, 511-517.

RADJASA, O.K.; VASKE, Y.M.; NAVARRO, G.; VERVOORT, H.C.; TENNEY, K.; LININGTON, R.G.; CREWS, P.; Highlights of marine invertebrate-derived biosynthetic products: their biomedical potential and possible production by microbial associates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2011**, 19 (22), 6658-74.

RHEIMS, H.; & STACKEBRANDT, E.; Application of nested polymerase chain reaction for the detection of as yet uncultured organisms of the class Actinobacteria in environmental samples. *Environmental Microbiology*. **1999**, 1 (2), 137-143.

RHEINHEIMER, G.; *Aquatic Microbiology*. 4th Edn., John Wiley and Sons, New York, ISBN-10: 0471926957, **1992**, pp: 363.

RINEHART, K.L.; HOLT, T.G.; FREGEAU, N.L.; STROH, J.G.; KEIFER, P.A.; SUN, F.; LI, L.H.; MARTIN, D.G.; Ecteinascidins 729, 743, 745, 759A, 759B, and 770: potent antitumor agents from the Caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata*. *The Journal of Organic Chemistry*. 1990, 55, 4512 – 4515.

ROSA, D.; MITO, M. e TOMMONARO, G.; Marine bacteria associated with sponge as source of cyclic peptides. *Biomolecular Engineering*. **2003**, 20, 311-316.

RUDI, A.; KASHMAN, Y.; BENAYAHU, Y.; SCHLEYER, M.; Amino Acid

Derivatives from the Marine Sponge *Jaspis digonoxea*. *Journal of Natural Products*. **1994**, 57 (6), 829-832.

SALOMON, C.E.; MAGARVEY, N.A.; SHERMAN, D.H.; Merging the potential of microbial genetics with biological and chemical diversity: an even brighter future for marine natural product drug discovery. *Natural Product Reports*. **2004**, 21 (1), 105-121.

SÁNCHEZ, C.; MÉNDEZ, C.; SALAS, J.A.; Indolocarbazole natural products: occurrence, biosynthesis, and biological activity. *Natural Product Reports*. **2006**, 23 (6), 1007-1045.

SCHUPP, T.; TOUPET, C.; ENGEL, N.; GOFF, S.; Cloning and sequence analysis of the putative rifamycin polyketide synthase gene cluster from *Amycolatopsis mediterranei*. *FEMS Microbiology Letters*. **1998**, 159 (2), 201-207.

SENSI, P.; MARGALITH, P.; TIMBAL, M.T.; Rifomycin, a new antibiotic; preliminary report. *Farmaco*. **1959**, 14, 146-147.

SENER, P.D.; & Sievers, E.L.; The discovery and development of brentuximab vedotin for use in relapsed Hodgkin lymphoma and systemic anaplastic large cell lymphoma. *Nature Biotechnology*. **2012**, 30 (7), 631-637.

SIMMONS, T.L.; ANDRIANASOLO, E.; MCPHAIL, K.; FLATT, P.; GERWICK, W.H.; Marine natural products as anticancer drugs. *Molecular Cancer Therapeutics*. **2005**, 4 (2), 333-342.

SOARES, D.G.; ESCARGUEIL, A.E.; POINDESSOUS, V.; SARASIN, A.; DE GRAMONT, A.; BONATTO, D.; HENRIQUES, J.A.; LARSEN, A.K.; Replication and homologous recombination repair regulate DNA double-strand break formation by the antitumor alkylator ecteinascidin 743. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U. S. A.*, **2007**, 104, 13062-13067.

STAATS, P.S.; YEARWOOD, T.; CHARAPATA, S.G.; PRESLEY, R.W.; WALLACE, M.S.; BYAS-SMITH, M.; FISHER, R.; BRYCE, D.A.; MANGIERI, E.A.; LUTHER, R.R.; MAYO, M.; MCGUIRE, D.; ELLIS, D.; Intrathecal ziconotide in the treatment of refractory pain in patients with cancer or AIDS – A randomized controlled trial. *The Journal of the American Medical Association*. **2004**, 291(1), 63–70.

STACKEBRANDT, E.; RAINEY, F.A.; WARD-RAINEY, N.I.; Proposal for a New Hierarchic Classification System, Actinobacteria classis nov. *International journal of systematic bacteriology*, **1997**, 47 (2), 479-491.

STAMATAKIS, A. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*. **2006**, 22, 2688–90.

MIYADOH, S.; Research on antibiotic screening in Japan over the last decade: A producing microorganisms approach. *Actinomycetologica*. **1993**, 100-106.

STIERLE, A.C.; CARDELLINA, J.H.; STROBEL, G.A.; Maculosin, a host-specific phytotoxin for spotted knapweed from *Alternaria alternata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **1988b**, 85, 8008-8011.

STONIK, V.A.; Marine Natural Products: A Way to New Drugs. *Acta Naturae*. **2009**, 1(2), 15-25.

STRÖM, K.; SJÖGREN, J.; BROBERG, A.; SCHNÜRER, J.; Lactobacillus plantarum MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid. *Applied and Environmental Microbiology*. **2002**, 68 (9), 4322-4327.

SUBRAMANI, R. & AALBERSBERG, W.; Marine actinomycetes: an ongoing source of novel bioactive metabolites. *Microbiological Research*. **2012**, 167 (10), 571-580.

SUN, W.; DAI, S.; JIANG, S.; WANG, G.; LIU, G.; WU, H.; LI, X.; Culture-dependent and culture-independent diversity of Actinobacteria associated with the marine sponge *Hymeniacidon perleve* from the South China Sea. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **2010**, 98 (1), 65-75.

SURUP, F.; SHOJAEI, H.; VON ZEZSCHWITZ, P.; KUNZE, B.; GROND, S.; Iromycins from *Streptomyces* sp. and from synthesis: new inhibitors of the mitochondrial electron transport chain. *Bioorganic & medicinal chemistry*. **2008**, 16 (4), 1738-1746.

TAKAHASHI, H. & TAMURA, S. Piericidin A: A new inhibitor of mitochondrial electron transport. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1966**, 25 (4), 373-377.

TAKAHASHI, N; SUZUKI, A & TAMURA, S. Structure of Piericidin A. *Journal of the American Chemical Society*. **1965**, 87 (9), 2066-2068.

TAKAHASHI, Y.; SHINOSE, M.; SEINO, A.; IWAI, Y.; OMURA, S.; Transfer of Staurosporine-Producing Strain *Streptomyces staurosporeus* AM-2282 to the Genus *Saccharothrix* as *Saccharothrix aerocolonigenes* (Labeda 1986) subsp. *staurosporeus* subsp. nov. *Actinomycetologica*. **1995**, 9 (1), 19-26.

TAMURA, S.; TAKAHASHI, N.; MIYAMOTO, S.; MORI, R.; SUZUKI, S.; NAGATSU, J.; Isolation and Physiological Activities of Piericidin A, A Natural Insecticide Produced by *Streptomyces*. *Journal Agricultural and Biological Chemistry*. **1963**, 27 (8), 576-582.

THOMAS, X.; Chemotherapy of acute leukemia in adults. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. **2009**, 10, 221–237.

THOMPSON, C. & WHITLEY, R.; Neonatal herpes simplex virus infections: where are we now? *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **2011**, 697, 221–230.

TORSVIK, V.; GOKSOYR, J.; DAAE, F.L.; High diversity of DNA of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. **1990**, 56, 782-787.

TRUJILLO, M. E. & GOODFELLOW, M.; Numerical phonetic classification of clinically significant aerobic sporoactinomycetes and related organisms. *Antonie van Leeuwenhoek*. **2003**, 84, 39-68.

VAN DE DONK, N.W.; & DHIMOLEA, E.; Brentuximab vedotin, *MAbs*. **2012**, 4, 458–465.

VASKE-Jr., T.; LESSA, R.P.; NÓBREGA, M.F.; AMARAL, F.M.D.; Arquipélago de São Pedro e São Paulo: Histórico e Recursos Naturais. NAVE/LABOMAR-UFC. **2010**, 242p.

VENTURA, M.; CANCHAYA, C.; TAUCH, A.; CHANDRA, G.; FITZGERALD, G.F.; CHATER, K.F.; VAN SINDEREN, D.; Genomics of Actinobacteria: Tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **2007**, 71, 495–548.

VERWEIJ, J.; Soft tissue sarcoma trials: one size no longer fits all. *Journal of Clinical Oncology*. **2009**, 27, 3085–3087.

WAITES, M.J.; MORGAN, N.L.; HIGTON, G.; ROCKEY, J.S; Industrial Microbiology: An Introduction. Oxford, UK: Blackwell Science. **2001**.

WANG, Y.X.; GAO, D.; PETTUS, M.; PHILLIPS, C.; BOWERSOX, S.S.; Interactions of intrathecally administered ziconotide, a selective blocker of neuronal N-type voltage-sensitive calcium channels, with morphine on nociception in rats. *Pain*. **2000**, 84 (2-3), 271–281.

WARD, A.C.; & BORA, N.; Diversity and biogeography of marine actinobacteria. *Current Opinion in Microbiology*. **2006**, 9, 279-286.

WARD, D.M.; WELLER, R.; BATESON, M.M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature*. **1990**, 345, 63–65.

WATVE, M.G.; TICKOO, R.; JOG, M.M.; BHOLE, B.D.; How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*. *Archives of Microbiology*. **2001**, 176, 386-390.

WHITLEY, R.; Neonatal herpes simplex infection. *Current Opinion in Infectious Diseases*. **2004**, 17, 243–246.

WHITLEY, R.J.; TUCKER, B.C.; KINKEL, A.W.; BARTON, N.H.; PASS, R.F.; WHELCHER, J.D.; COBBS, C.G.; DIETHELM, A.G.; BUCHANAN, R.A.; Pharmacology, Tolerance, and Antiviral Activity of Vidarabine Monophosphate in Humans. *Antimicrob Agents Chemother*. **1980**, 18 (5), 709–715.

WILKE, D. V.; JIMENEZ, P.C.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; ARAUJO, R.M.; SILVA, W.M.B.; SILVEIRA, E.R.; PESSOA, O.D.L.; BRAZFILHO, R.; LOPES, N.P.; COSTA-LOTUFO, L.V.; Cytotoxic lipidic  $\alpha$ -amino acids from the zoanthid *Protopalythoa variabilis* from the Northeastern coast of Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. **2009**, 20 (8), 1455-1459.

WILLIAMS, P.G.; ASOLKAR, R.N.; KONDRATYUK, T.; PEZZUTO, J.M.; JENSEN, P.R.; FENICAL, W. Saliniketals A and B, bicyclic polyketides from the marine actinomycete *Salinispora arenicola*. *Journal of Natural Products*. **2007**, 70, 83-88.

XIE, Q.; WANG, Y.; HUANG, Y.; WU, Y.; BA, F.; LIU, Z.; Description of *Lentzea flaviverrucosa* sp. nov. and transfer of the type strain of *Saccharothrix aerocolonigenes* subsp. *staurosporea* to *Lentzea albida*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **2002**, 52 (5), 1815-1820.

XIN, Y.; HUANG, J.; DENG, M.; ZHANG, W.; Culture -independent nested PCR method reveals high diversity of actinobacteria associated with the marine sponges *Hymeniacion perleve* and *Sponge* sp. *Antonie van Leeuwenhoek*. **2008**, 94 (4), 533-542.

YAP, T.A.; CARDEN, C.P.; KAYE, S.B.; Beyond chemotherapy: targeted

therapies in ovarian cancer. *Nature Reviews Cancer*. **2009**, 9, 167–181.

Yu, T.W.; Shen, Y.; Doi-Katayama, Y.; Tang, L.; Park, C.; Moore, B.S.; Richard Hutchinson, C.; Floss, H.G.; Direct evidence that the rifamycin polyketide synthase assembles polyketide chains processively. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA. **1999**, 96, 9051-9056.

ZEWAIL-FOOTE, M. & HURLEY, L.H.; Differential rates of reversibility of ecteinascidin 743-DNA covalent adducts from different sequences lead to migration to favored bonding sites. *Journal of the American Chemical Society*. **2001**, 123, 6485– 6495.

ZHANG Z, KUDO T, NAKAJIMA Y, WANG Y; Clarification of the relationship between the members of the family Thermomonosporaceae on the basis of 16S rADN, 16S–23S rRNA internal transcribed spacer and 23S rADN sequences and chemotaxonomic analyses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **2001**, 1, 373–383.

ZHANG, Z.; WANG, Y. & RUAN, J.; Reclassification of Thermomonospora and Microtetraspora. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **1998**, 48, 411-422.

ZHENG, L.; LIN, X.; WU, N.; LIU, M.; ZHENG, Y.; SHENG, J.; JI, X.; SUN, M.; Targeting cellular apoptotic pathway with peptides from marine organisms. *Biochimica et Biophysica Acta*. **2013**, 1836 (1), 42-48.

ZHENG, Z.; ZENG, W.; HUANG, Y.; YANG, Z.; LI, J.; CAI, H.; SU, W.; Detection of antitumor and antimicrobial activities in marine organism associated actinomycetes isolated from the Taiwan Strait, China. *FEMS Microbiology Letters*. **2000**, 188, 87-91.

ZHOU, J.; MARY ANN BRUNS, M.A.; TIEDJE, J.M.; DNA Recovery from Soils of Diverse Composition. *Applied and environmental microbiology*. **1996**, 62 (2), 316–322.

ZIEMERT, N.; LECHNER, A.; WIETZ, M.; MILLÁN-AGUIÑAGA, N.; CHAVARRIA, K.L.; JENSEN, P.R.; Diversity and evolution of secondary metabolism in the marine actinomycete genus *Salinispora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **2014**, 111 (12), 1130 – 1139.

## Anexo I

### Equipamentos e Soluções

#### ❖ Equipamentos:

#### EQUIPAMENTOS

Banho-maria, DELLTA Modelo 105Di®

Centrífuga Centimicro, FANEN Modelo 212®

Centrífuga Excelsa Baby, I FANEN Modelo 206®

Centrífuga de placas, Eppendorf Modelo Centrifuge 5403®

Centrífuga de lâminas, Shandon Southern Cytospin®

Citômetro de fluxo, Guava EasyCyte mini®

Colunas analíticas para CLAE Shimadzu ODS

Colunas preparativas para CLAE Shimadzu ODS

Cromatógrafo líquido Shimadzu com bomba Modelo LC6A

Detector Ultra-Violeta com Integrador Modelo C-R6A

Deonizador de água Milli-Q, Milipore®

Espectrofotômetro de placa DTX-880, Beckman Coulter®

Fotodocumentador (Gel Doc XR+), Bio-Rad Laboratories, Inc.

Fluxo laminar, VECO®

High Throughput Screening (HTS)/Laboratory Automation Workstation, Biomek 3000, Beckman Coulter®

Incubadora de células, (CO<sub>2</sub> Water-Jacket Incubator) NUAIRE TS Autoflow®

Injetor Manual Rheodyne Modelo 7125

Máquina fotográfica digital, Olympus C-7070®

Microscópio óptico, Metrimpex Hungary/PZO-Labimex Modelo Studar lab®

Microscópio óptico de inversão, Nikon Diaphot®

pHmetro, Micronal B474®

Pipetas automáticas, Gilson®

RMN Bruker DPX-300

Agitador de tubo, Donner AD 8850®

Termociclador Bio-Rad C1000, Bio-Rad Laboratories, Inc.

Termociclador Mastercycler Gradient, Eppendorf

**Anexo I – Equipamentos e soluções**

---

**❖ Solventes**

<b>SOLVENTE</b>	<b>MARCA</b>
Acetato de Etila	Vetec®
Ácido Clorídrico	Vetec®
Álcool Etilico	Vetec®
Álcool Isoamílico	Sigma®
Álcool Metílico	Vetec®
Álcool N-Butílico	Vetec®
Clorofórmio	Sigma®
Diclorometano	Vetec®
Dimetilsulfóxido	Vetec®
Fenol	Sigma®

**❖ Cromatografia**

<b>FASE ESTACIONÁRIA</b>	<b>MARCA</b>
Sephadex LH-20	Pharmacia
Sílica gel 60 GF <sub>254</sub>	Merck

## Anexo I – Equipamentos e soluções

### ❖ Sais

SAL	MARCA
Cloreto de sódio (NaCl)	Vetec®
EDTA	Sigma®
Sulfato de sódio (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Vetec®
Tris ((HOCH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CNH <sub>2</sub> )	Vetec®
Fosfato dissódico (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Vetec®
Fosfato monossódico (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Vetec®

### ❖ Extração do ADN total

SOLUÇÃO	COMPOSIÇÃO	MARCA
Tampão de extração	Tris HCl (100mM) pH 8.0	Vetec®
	EDTA (100mM) pH 8.0	Vetec®
	Fosfato de sódio (100mM) pH 8.0	Vetec®
	NaCl (1,5M)	Vetec®
	CTAB (1%)	Sigma®
	Proteinase K (10mg/mL)	Sigma®
SDS (20%)	20g de SDS	Sigma®
	H <sub>2</sub> O Mili-Q (q.s.p. 100mL)	-
Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico	25:24:1	Sigma®

## Anexo I – Equipamentos e soluções

### ❖ PCR e DGGE

SOLUÇÃO	COMPOSIÇÃO	MARCA
<b>Pré-Mix</b>	Tampão 5X	-
	Cloreto de magnésio (25mM)	Sigma®
	dNTPs (10mM)	-
	Primers (5µM)	-
	Taq. Polimerase (5U/µL)	Invitrogen™
<b>TBE (Tris/Borato/EDTA)</b>	Tris (107,81g/L) (0,89M)	Vetec®
	EDTA (5,8g/L) (0,02M)	Vetec®
	Ácido bórico (55,0g/L) (0,89M)	Vetec®
<b>Gel de agarose (2%)</b>	TBE (0,5X)	-
	Agarose 2g	Invitrogen™
<b>Solução Desnaturante</b>	Ureia (7M)	Sigma®
	Formamida (40%)	Sigma®
<b>TAE 0,5X (Tris-Acetato-EDTA)</b>	TRIS base (242 g)	Sigma®
	Ácido acético glacial (57,1 mL)	Sigma®
	EDTA dissódico (Na <sub>2</sub> EDTA) (0,5 M) (pH 8.0)	Sigma®
	H <sub>2</sub> O Mili-Q (q.s.p. 1000mL)	-

## Anexo I – Equipamentos e soluções

### ❖ Soluções

#### ▪ Cultura de células

SOLUÇÃO	COMPOSIÇÃO						MARCA		
PBS (pH = 7,2)	8,766 g de NaCl						Labsynth®		
	2,14 g de NaHPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O						Labsynth®		
	0,276 g de NaHPO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O						Labsynth®		
Antibiótico	Penicilina 10.000 U.I./mL						Cultilab®		
	Estreptomicina 10mg/mL								
RPMI 1640	<b>Sais inorgânicos:</b>						Cultilab®		
	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	100,00	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	100,00	NaHCO <sub>3</sub>	2.000,00			
	KCL	400,00	NaCl	6.000,00	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	800,00			
	<b>Aminoácidos:</b>								
	L-arginina.HCL	200,00	L-glutamina	300,00	L-prolina	20,00			
	L-asparagina.H <sub>2</sub> O	50,00	L-soleucina	20,00	L-tirosina	28,00			
	L-ácido aspártico	20,00	L-leucina	50,00	L-serina	30,00			
	L-cistina	50,00	L-lisina.HCl	40,00	L-valina	20,00			
	L-ácidoglutâmico	20,00	L-metionina	15,00	L-treonina	20,00			
	L-hidroxiprolina	15,00	L-fenilalanina	15,00					
	L-histidina.HCl.H <sub>2</sub> O	10,00	L-triptofano	5,00					
	<b>Vitaminas:</b>								
	Biotina	0,200	Ácido p-aminobenzóico	1,000	Ácido fólico	1,000			
	Pantotenato de cálcio	0,250	Piridoxina.HCl	1,000	Inositol	35,000			
	Cloreto de colina	3,000	Riboflavina	0,200	Nicotinamida	1,000			
	Tiamina.HCl	1,000	VitaminaB12	0,005					
	<b>Outros componentes:</b>								
	Glicose	2.000,00	Glutationa	1,00	Vermelho de fenol	5,00			
	SFB	-						Cultilab®	
	Tripsina 0,25%	50 mL de Tripsina 2,5%						Cultilab®	
		0,125 g de EDTA						Proquímios®	
		450 mL de PBS						-	

## Anexo I – Equipamentos e soluções

### ❖ Ensaio de atividade antiproliferativa

#### ▪ MTT

SOLUÇÃO	COMPOSIÇÃO	MARCA
MTT	20 mg de MTT	Sigma®
	100 mL de PBS	-

### ❖ Identificação Molecular

#### ▪ Extração do ADN Metagenômico

SOLUÇÃO	COMPOSIÇÃO	MARCA
Tampão de lise	CTAB (2% (m/v))	Sigma®
	NaCl (1,4M)	Sigma®
	EDTA (20 mM)	Vetec®
	Tris HCl (100mM) pH 8.0	Vetec®
	Proteinase K (5µg/mL)	Invitrogen™
	2-mercaptoetanol (0,5% (v/v))	Sigma®
Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico	25:24:1	Sigma®
Solução de Acetato de amônio	Acetato de amônio (5M)	Vetec®
	H <sub>2</sub> O Mili-Q (q.s.p. 1000mL)	-
Tampão de eluição (TE)	Tris HCl (10mM) pH 8.0	Vetec®
	EDTA (1mM)	Vetec®

**Anexo I – Equipamentos e soluções**

---

**❖ Amplificação do ADN genômico****▪ PCR**

<b>SOLUÇÃO</b>	<b>COMPOSIÇÃO</b>	<b>MARCA</b>
<b>Pré-Mix</b>	Kit GoTaq® Green Máster Mix	PROMEGA
<b>Gel de agarose</b>	Agarose (Ultra Pura) (1g/100mL)	Sigma®
	TBE (Tris/Borato/EDTA) (0,5X)	-
<b>Purificação do produto de PCR</b>	ExoSAP-IT	ExoSAP-IT®

## Anexo II

## Meios de cultura para microbiologia

## ❖ Composição dos meios de cultura para microrganismos

SOLUÇÃO	COMPOSIÇÃO	MARCA
<b>Água do Mar ágar (SWA)</b>	Ágar (18g/L)	Difco™
	H <sub>2</sub> O destilada (25%)	-
	H <sub>2</sub> O do mar (75%)	-
<b>Amido Caseína ágar (SCA)</b>	Caseína (1g/L)	Himedia®
	Amido (10g/L)	
	Ágar (15g/L)	
	H <sub>2</sub> O do mar (37g/L)	
<b>Metais Traços ágar (TMA)</b>	Glicose (0,1g/L)	Sigma®
	Extrato de levedura (0,1g/L)	Difco™
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,5g/L)	Vetec®
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,7g/L)	Vetec®
	KNO <sub>3</sub> (0,1g/L)	Vetec®
	NaCl (0,3g/L)	Vetec®
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (0,1g/L)	Vetec®
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O (0,02g/L)	Vetec®	
<b>Suplemento para (TMA)</b>	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (0,2g/L)	Vetec®
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (0,18g/L)	Vetec®
	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O (0,02g/L)	Vetec®
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O (0,09g/L)	Vetec®
	CoSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (0,01g/L)	Vetec®
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (0,1g/L)	Vetec®
<b>Meio A1</b>	Amido (10g/L)	Difco™
	Extrato de levedura (4g/L)	Difco™
	Peptona (2g/L)	Difco™
<b>Suplemento para (A1)</b>	CaCO <sub>3</sub> (0,5g/L)	Vetec®
	KBr (5g/L)	Sigma®
	Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> (5g/L)	Sigma®

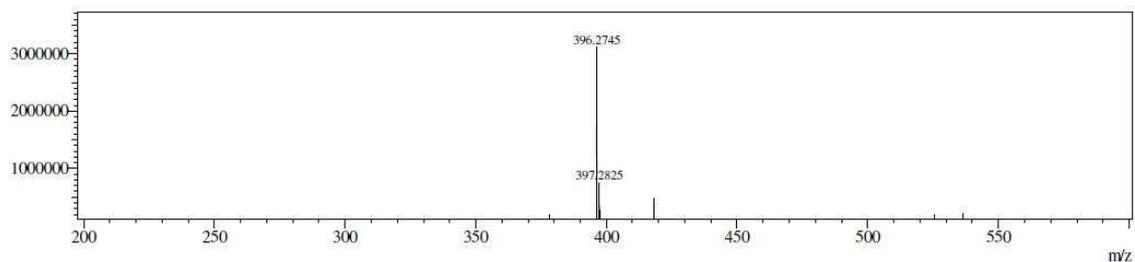
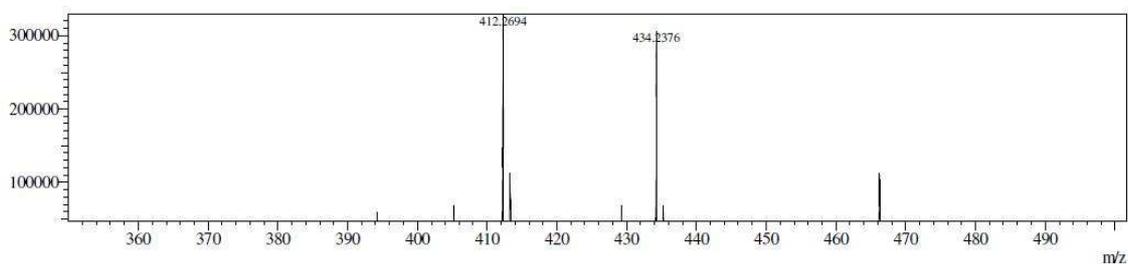
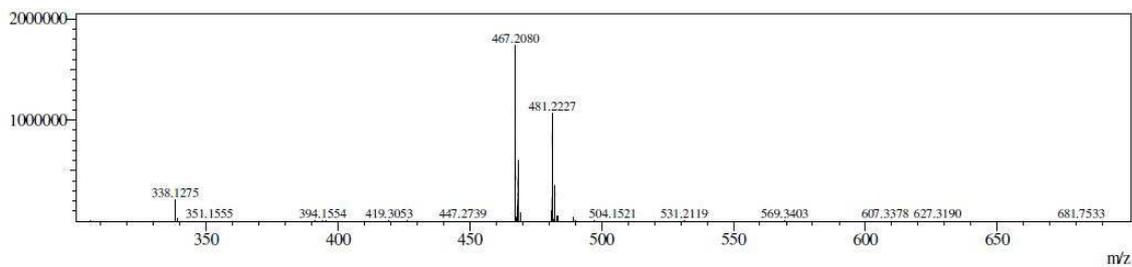
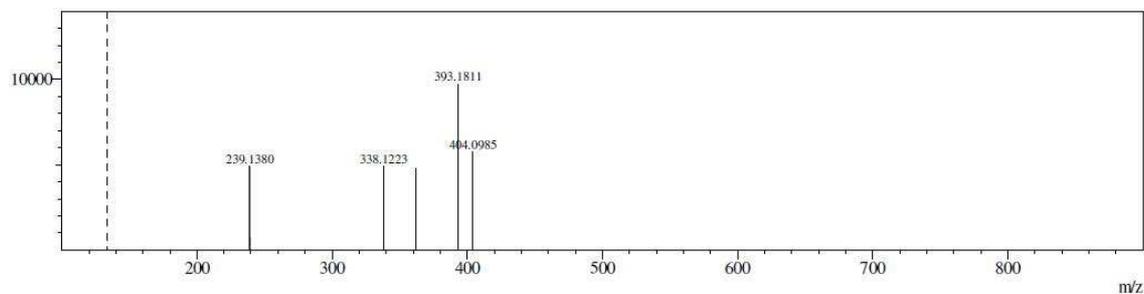
---

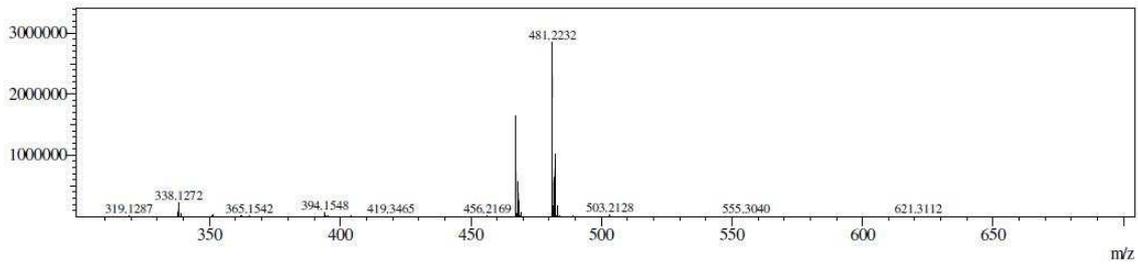
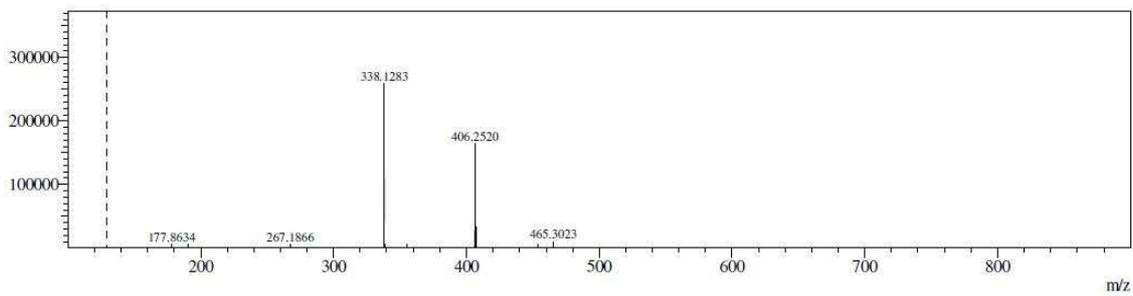
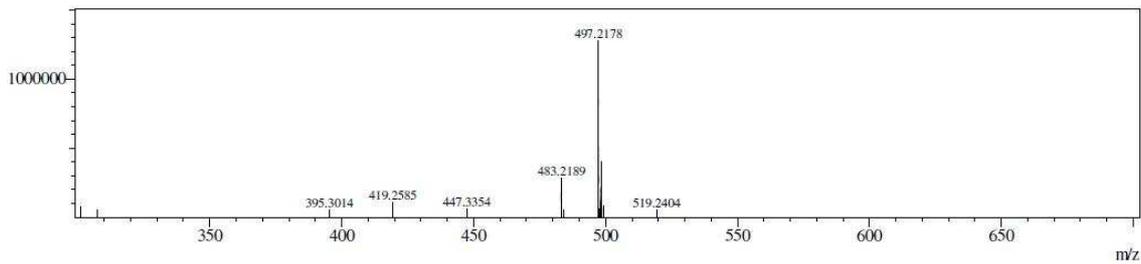
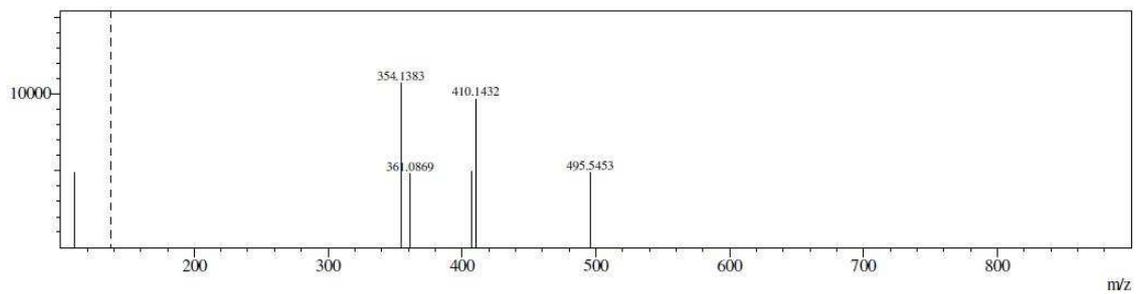
**MATERIAL SUPLEMENTAR 01 - Desreplicação dos extratos das bactérias**

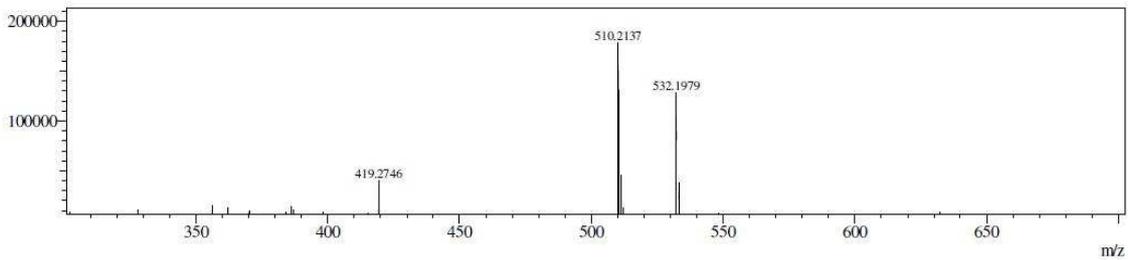
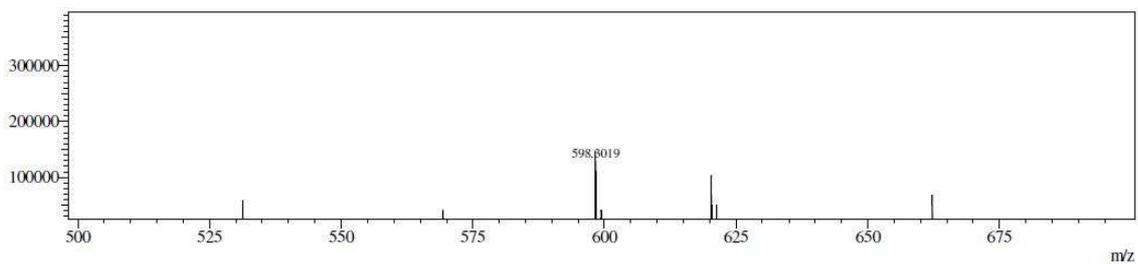
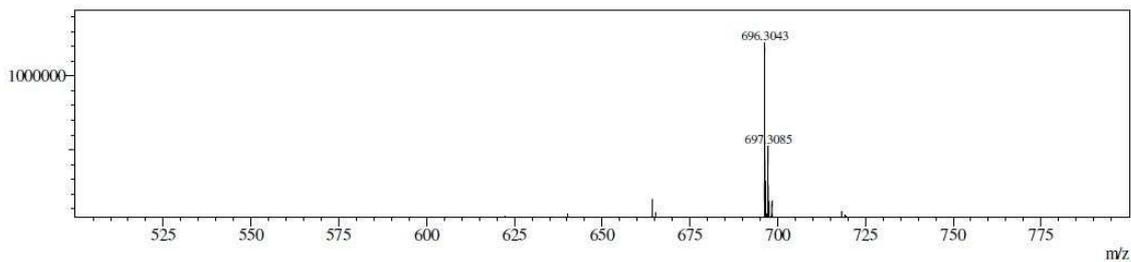
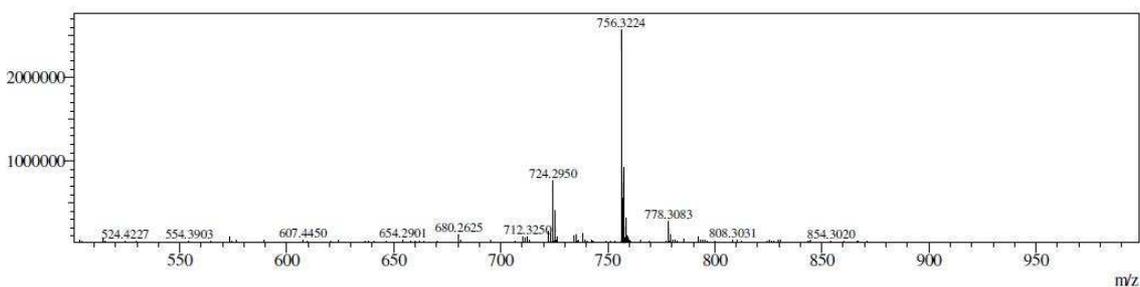
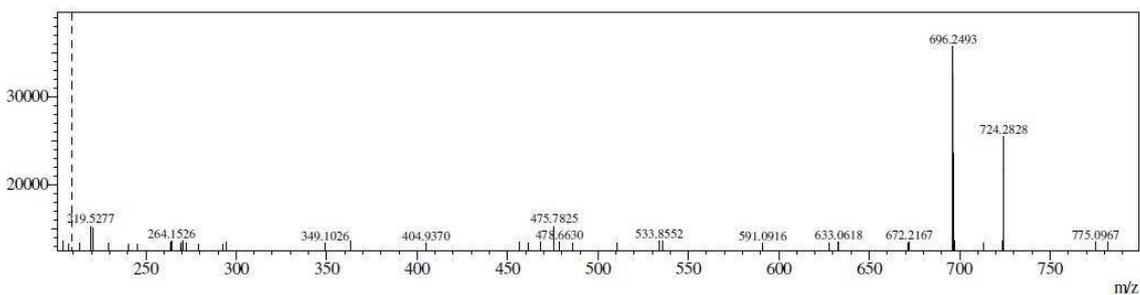
<b>Figura 01</b>	Espectro de HRESI-MS do composto salinicetal A (1)-----	107
<b>Figura 02</b>	Espectro de HRESI-MS do composto salinicetal B (2)-----	107
<b>Figura 03</b>	Espectro de HRESI-MS do composto estaurosporina (5)-----	107
<b>Figura 04</b>	Espectro de HRESI-MS/MS do composto estaurosporina (5)-----	107
<b>Figura 05</b>	Espectro de HRESI-MS do composto <i>N</i> -metil-estaurosporina (6)--	108
<b>Figura 06</b>	Espectro de HRESI-MS/MS do composto <i>N</i> -metil-estaurosporina (6) -----	108
<b>Figura 07</b>	Espectro de HRESI-MS do composto hidroxí- <i>N</i> -dimetil- estaurosporina (7) -----	108
<b>Figura 08</b>	Espectro de HRESI-MS/MS do composto hidroxí- <i>N</i> -dimetil- estaurosporina (7) -----	108
<b>Figura 09</b>	Espectro de HRESI-MS do composto <i>N</i> -carboxamida- estaurosporina (9) -----	109
<b>Figura 10</b>	Espectro de HRESI-MS do composto salinisporamicina A (10)----	109
<b>Figura 11</b>	Espectro de HRESI-MS do composto rifamicina S (11)-----	109
<b>Figura 12</b>	Espectro de HRESI-MS do composto rifamicina B (12)-----	109
<b>Figura 13</b>	Espectro de HRESI-MS/MS do composto rifamicina B (12)-----	109
<b>Tabela 01</b>	Compostos (1-12) identificados por HR-LCMS/MS nos extratos ativos obtidos das cepas de actinomicetos recuperados dos sedimentos de ASPSP-----	110

**Anexo III – Material suplementar**

---

**Figura 01** – Espectro de HRESI-MS do composto salinicetal A (1).**Figura 02** – Espectro de HRESI-MS do composto salinicetal B (2).**Figura 03** – Espectro de HRESI-MS do composto estaurosporina (5).**Figura 04** – Espectro de HRESI-EM/EM do composto estaurosporina (5).

**Anexo III – Material suplementar****Figura 05** – Espectro de HRESI-EM do composto *N*-metil-estaurosporina (6).**Figura 06** - Espectro de HRESI-EM/EM do composto *N*-metil-estaurosporina (6).**Figura 07** - Espectro de HRESI-EM do composto hidroxi-*N*-dimetil-estaurosporina (7).**Figura 08** - Espectro de HRESI-EM/EM do composto hidroxi-*N*-dimetil-estaurosporina (7).

**Anexo III – Material suplementar****Figura 09** – Espectro de HRESI-EM do composto *N*-carboxamida-estaurosporina (**9**).**Figura 10** – Espectro de HRESI-EM do composto salinisporamicina A (**10**).**Figura 11** – Espectro de HRESI-EM do composto rifamicina S (**11**).**Figura 12** – Espectro de HRESI-EM do composto rifamicina B (**12**).**Figura 13** - Espectro de HRESI-EM/EM do composto rifamicina B (**12**).

**Anexo III – Material suplementar**

**Tabela 01** - Compostos (1-12) identificados por HR-LCMS/MS nos extratos ativos obtidos das cepas de actinomicetos recuperados do sedimento do ASPSP.

Compostos	BRA132	157	159	166	167	172	175	190	199	204	205	206	207	210	211	212	213
1	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓
2	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓
3									✓								
4									✓								
5	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓				✓			✓
6	✓					✓	✓			✓							✓
7	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓				✓			✓
8									✓								
9	✓				✓					✓							✓
10					✓			✓			✓						✓
11	✓				✓	✓	✓			✓	✓	✓				✓	✓
12	✓							✓								✓	✓

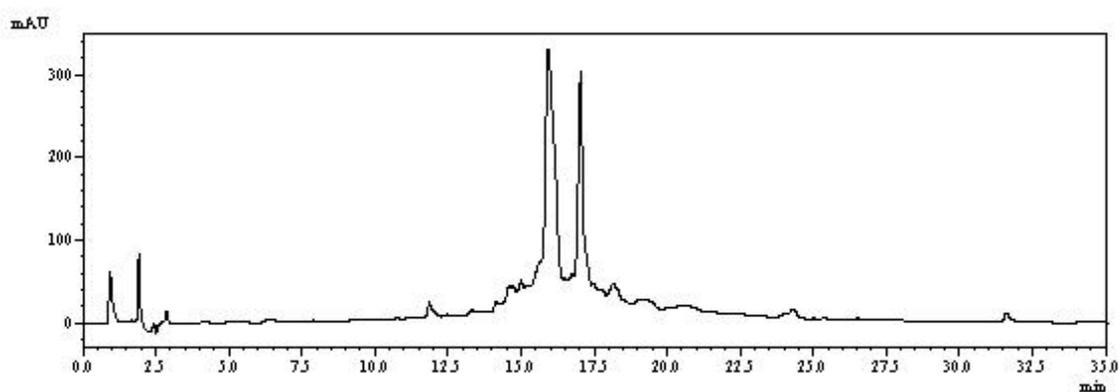
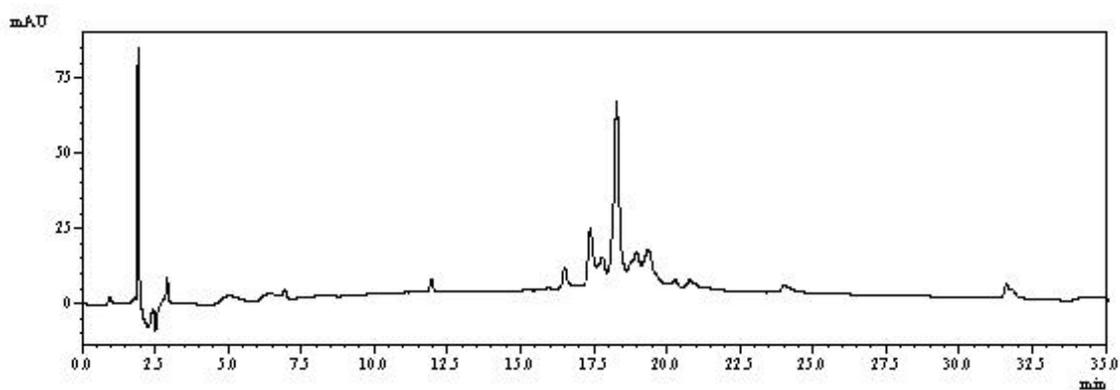
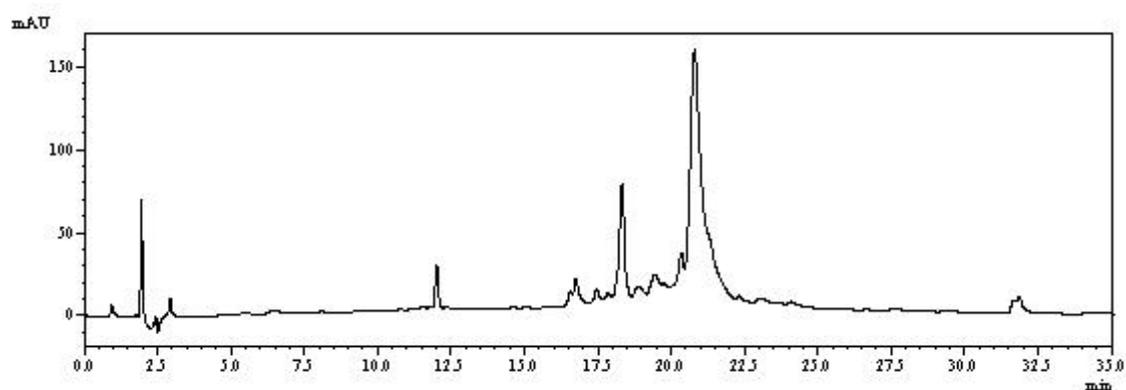
✓ - indica a presença do composto.

**MATERIAL SUPLEMENTAR 02 – Estudos da cepa BRA-132 (*Salinispora* sp.)**

<b>Figura 14</b>	CL-EM da fração BRA-132A1 E-J/4/5, salinicetal A (1) em $T_R$ 16,0 min-----	112
<b>Figura 15</b>	CL-EM da fração BRA-132A1 E-J/5-6/3, hidroxi-dimetil-estaurosporina (7) em $T_R$ 18,0 min-----	112
<b>Figura 16</b>	CL-EM da fração BRA-132A1 E-J/5-6/4, hidroxi-dimetil-estaurosporina (7) em $T_R$ 20,5 – 21,0 min-----	112
<b>Figura 17</b>	CL-EM da fração BRA-132A1 E-J/5-6/5, estaurosporina (5) e <i>N</i> -metil-estaurosporina (6) no $T_R$ 22,0 - 24,0 min-----	113

**Anexo III – Material suplementar**

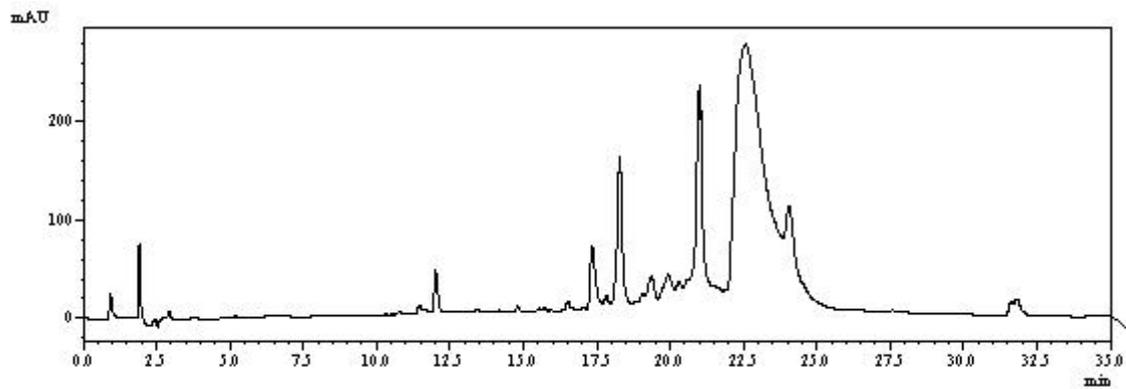
---

**Figura 14** - CL-EM da fração BRA-132A1 E-J/4/5, salinictal A (**1**) em  $T_R$  16,0 min**Figura 15** - CL-EM da fração BRA-132A1 E-J/5-6/3, hidroxi-dimetil-estaurosporina (**7**) em  $T_R$  18,0 min.**Figura 16** - CL-EM da fração BRA-132A1 E-J/5-6/4, hidroxi-dimetil-estaurosporina (**7**) em  $T_R$  20,5 - 21,0 min.

**Anexo III – Material suplementar**

---

**Figura 17** - CL-EM da fração BRA-132A1 E-J/5-6/5, estaurosporina (**5**) e *N*-metil-estaurosporina (**6**) no  $T_R$  22,0 - 24,0 min.



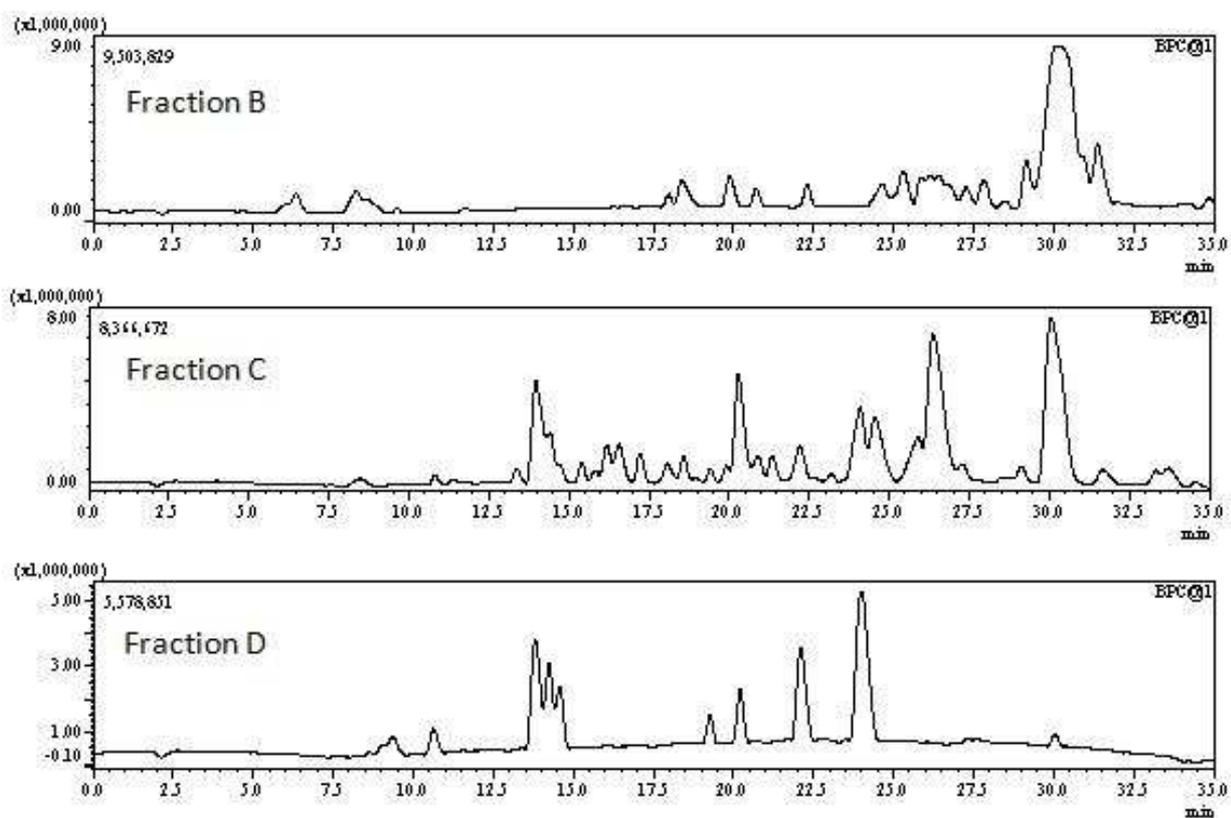
---

**MATERIAL SUPLEMENTAR 03 – Estudos da cepa BRA-199 (*Streptomyces* sp.)**

<b>Figura 18</b>	Cromatogramas de íons CL-EM para frações B, C e D em modo de ionização positiva, piericidina A ( <b>3</b> ) para $T_R$ 30,10 min, piericidina D ( <b>4</b> ) para $T_R$ 26,38 min e glicopiericidina A ( <b>8</b> ) para $T_R$ 24,06 min.-----	115
<b>Figura 19</b>	Espectro de $^1H$ NMR (MeOD, 500 MHz) do composto piericidina A ( <b>3</b> )-----	116
<b>Figura 20</b>	Espectro de HRESI-MS e HRESI-EM/EM da piericidina A ( <b>3</b> ): EM modo de ionização positiva (A), EM/EM no modo de ionização positiva (B) e, EM modo de ionização negativa (C). -----	117
<b>Figura 21</b>	Espectro de HRESI-MS da piericidina C ( <b>4</b> ): EM modo de ionização positiva (A) e EM modo de ionização negativa (B). ----	118
<b>Figura 22</b>	Espectro de HRESI-MS e HRESI-EM/EM da glicopiericidina A ( <b>8</b> ): EM modo de ionização positiva (A), EM/EM no modo de ionização positiva (B) e EM no modo de ionização negativa (C). -----	119
<b>Figura 23</b>	Espectro de $^1H$ NMR (MeOD, 300 MHz) da ciclo (Phe- <i>trans</i> -4-OH- Pro) ( <b>13</b> ). -----	120
<b>Figura 24</b>	Espectro de HRESI-MS e HRESI-MS/MS do composto (Phe- <i>trans</i> -4-OH-Pro) ( <b>13</b> ): EM no modo de ionização positiva (A), EM/EM no modo de ionização positiva (B) e EM no modo de ionização negativa (C). -----	121
<b>Figura 25</b>	Espectro de $^1H$ NMR (MeOD, 500 MHz) da ciclo (Phe-Pro) ( <b>14</b> ). -----	122
<b>Figura 26</b>	Espectro de HRESI-MS e HRESI-MS/MS do composto ciclo (Phe-Pro) ( <b>14</b> ): EM no modo de ionização positiva (A), EM/EM no modo de ionização positiva (B) e EM no modo de ionização negativa (C). -----	123
<b>Figura 27</b>	Espectro de $^1H$ NMR (MeOD, 500 MHz) da ciclo (Trp-Pro) ( <b>15</b> ). -----	124
<b>Figura 28</b>	Espectro de HRESI-MS e HRESI-MS/MS do composto ciclo (Trp-L-Pro) ( <b>15</b> ): EM no modo de ionização positiva (A), EM/EM no modo de ionização positiva (B) e EM no modo de ionização negativa (C). -----	125

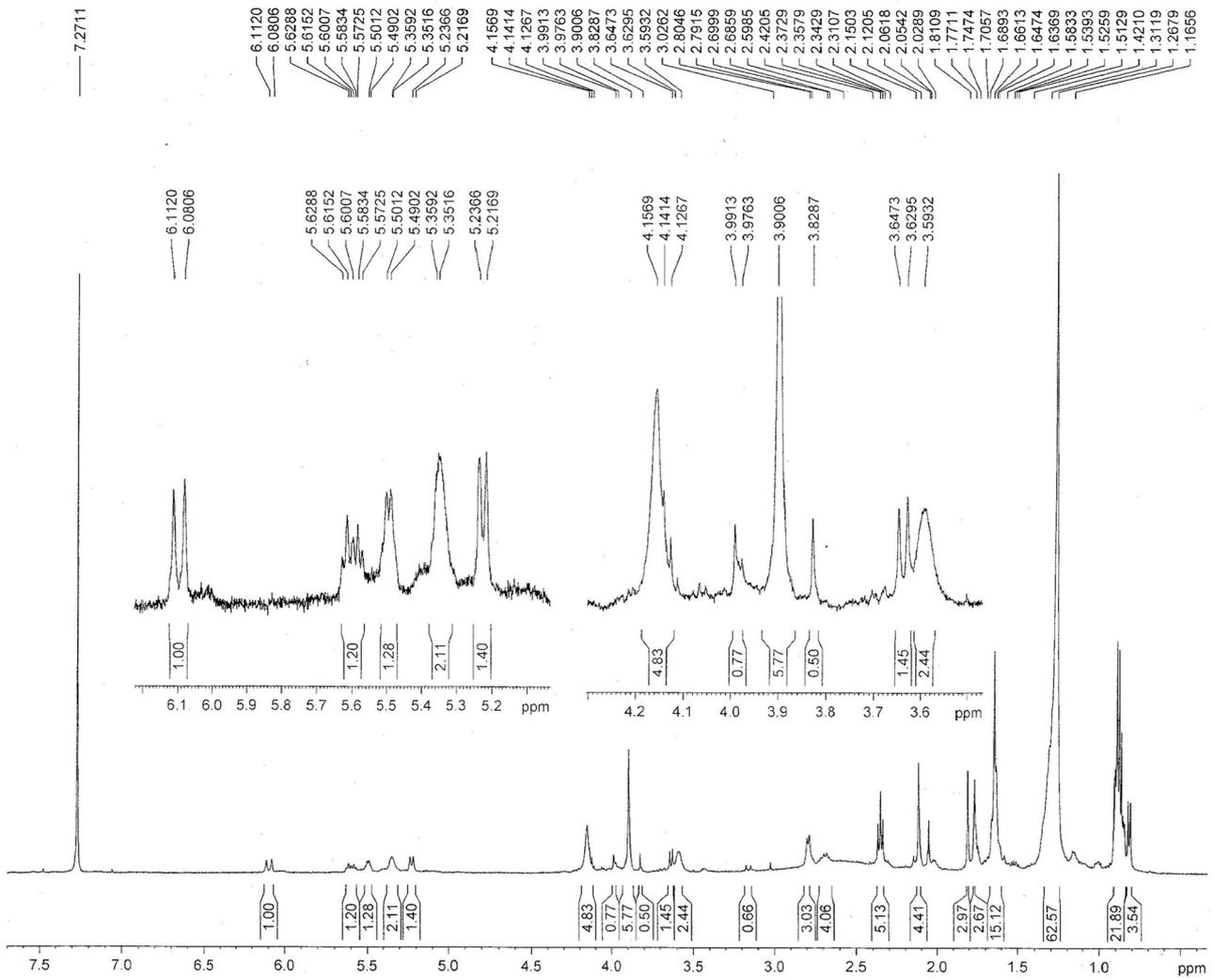
**Anexo III – Material suplementar**

**Figura 18** - Cromatogramas de íons CL-EM para frações B, C and D em modo de ionização positiva, piericidina A (**3**) para  $T_R$  30,10 min, piericidina D (**4**) para  $T_R$  26,38 min e glicopiericidina A (**8**) para  $T_R$  24,06 min.



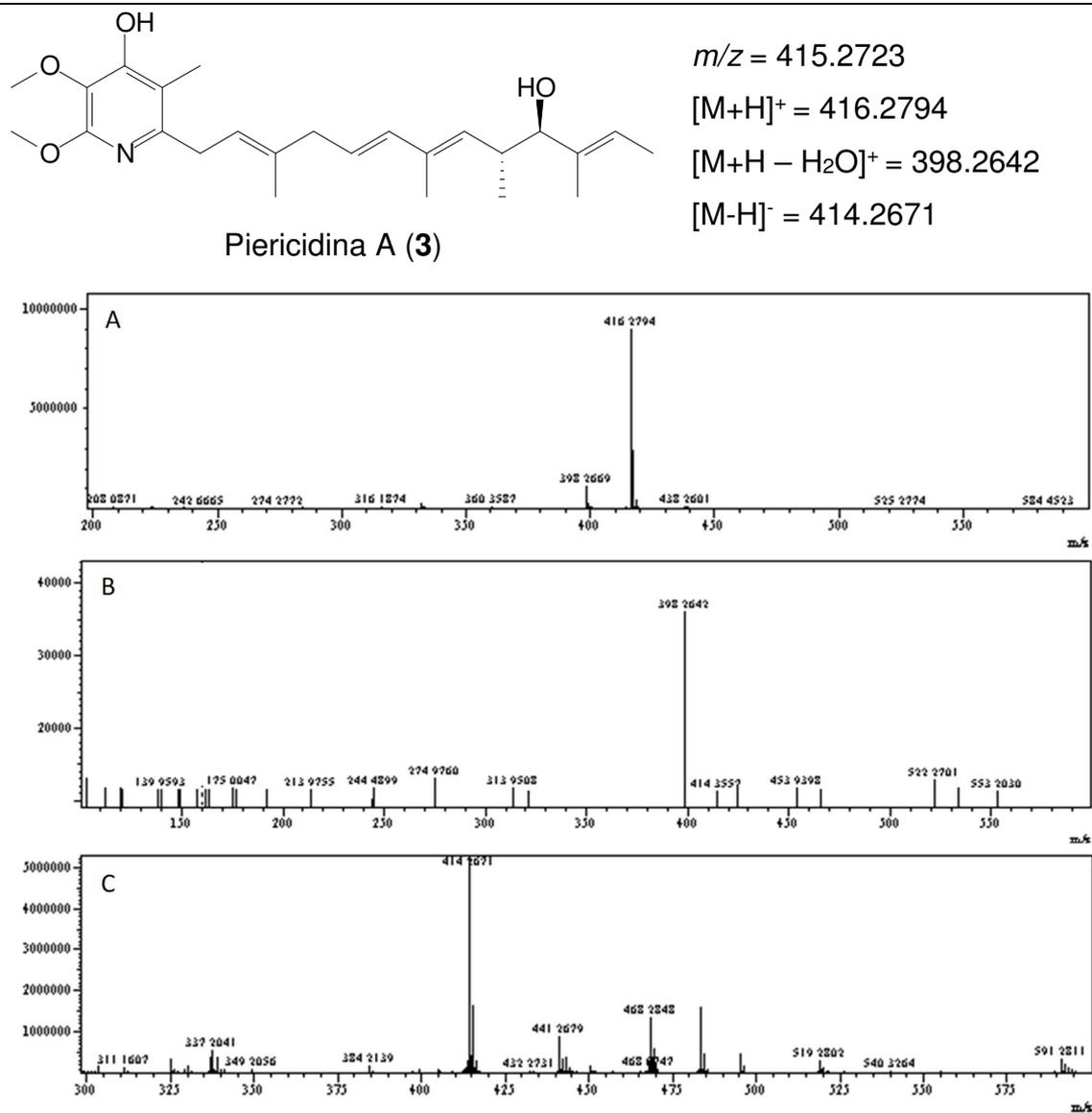
Anexo III – Material suplementar

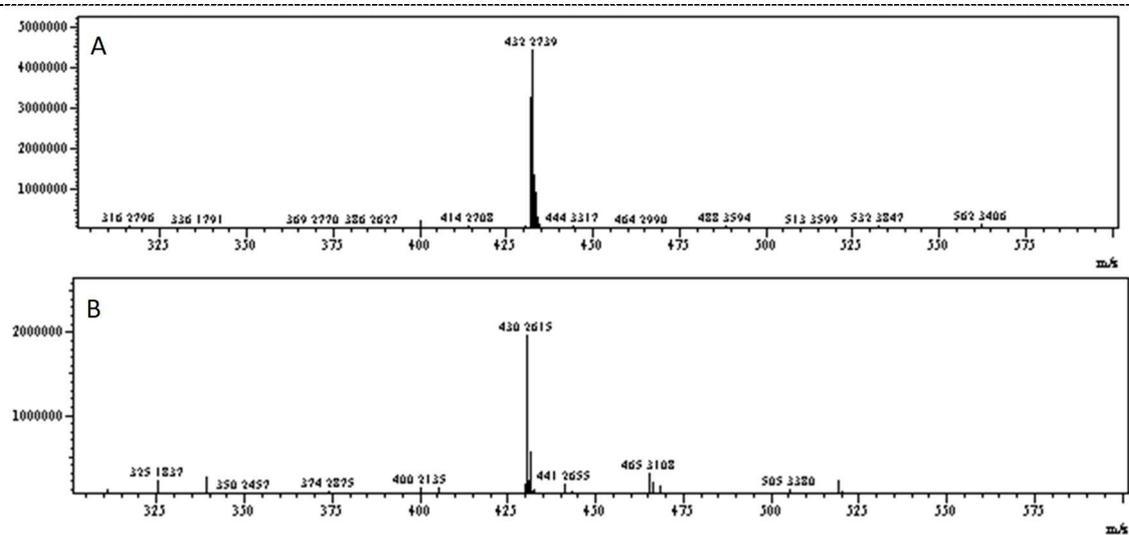
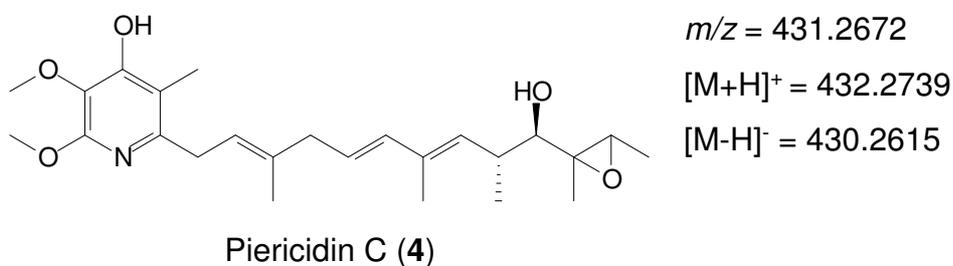
Figura 19 - Espectro de  $^1\text{H}$  NMR (MeOD, 500 MHz) espectro da piericidina A (3).



Anexo III – Material suplementar

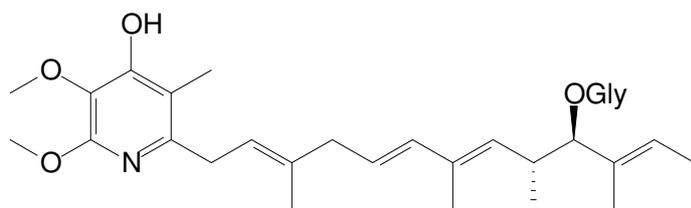
**Figura 20** - Espectro de HRESI-MS e HRESI-EM/EM da piericidina A (**3**): EM modo de ionização positiva (A), EM/EM no modo de ionização positiva (B) e, EM modo de ionização negativa (C).



**Anexo III – Material suplementar****Figura 21** – Espectro de HRESI-MS da piericidina C (**4**): EM modo de ionização positiva (A) e EM modo de ionização negativa (B).

**Anexo III – Material suplementar**

**Figura 22** - Espectro de HRESI-MS e HRESI-EM/EM da glicopiericidina A (**8**): EM modo de ionização positiva (A), EM/EM no modo de ionização positiva (B) e EM no modo de ionização negativa (C).



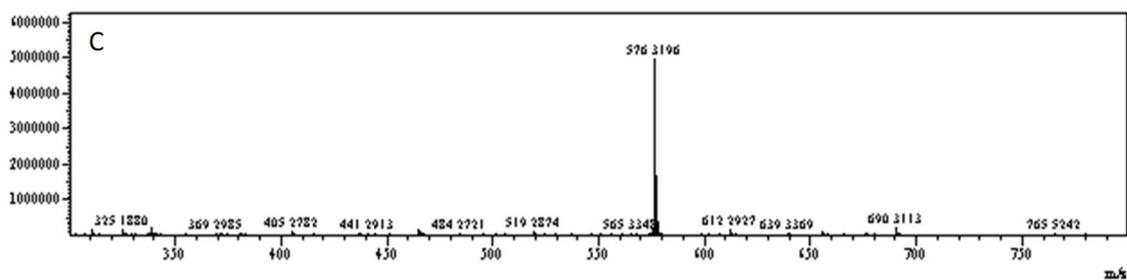
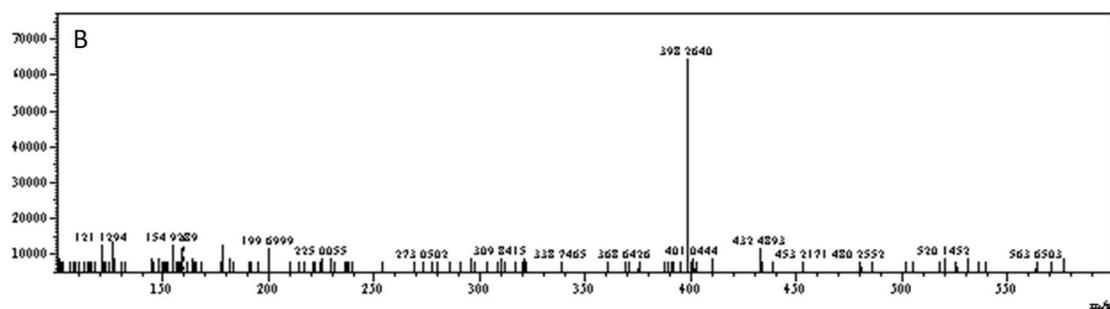
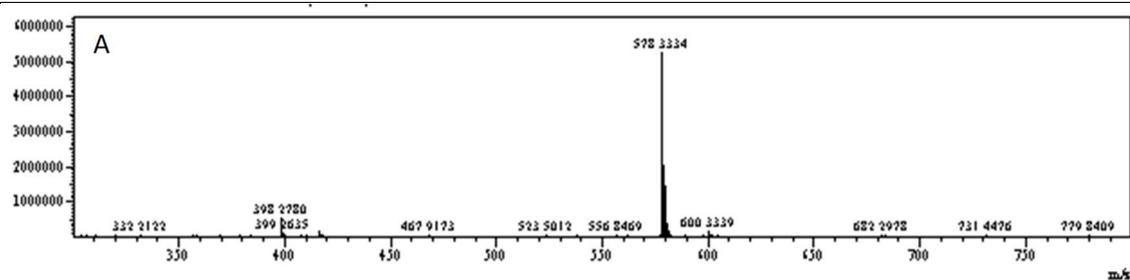
**Glicopiericidina A (8)**

$m/z = 577,3251$

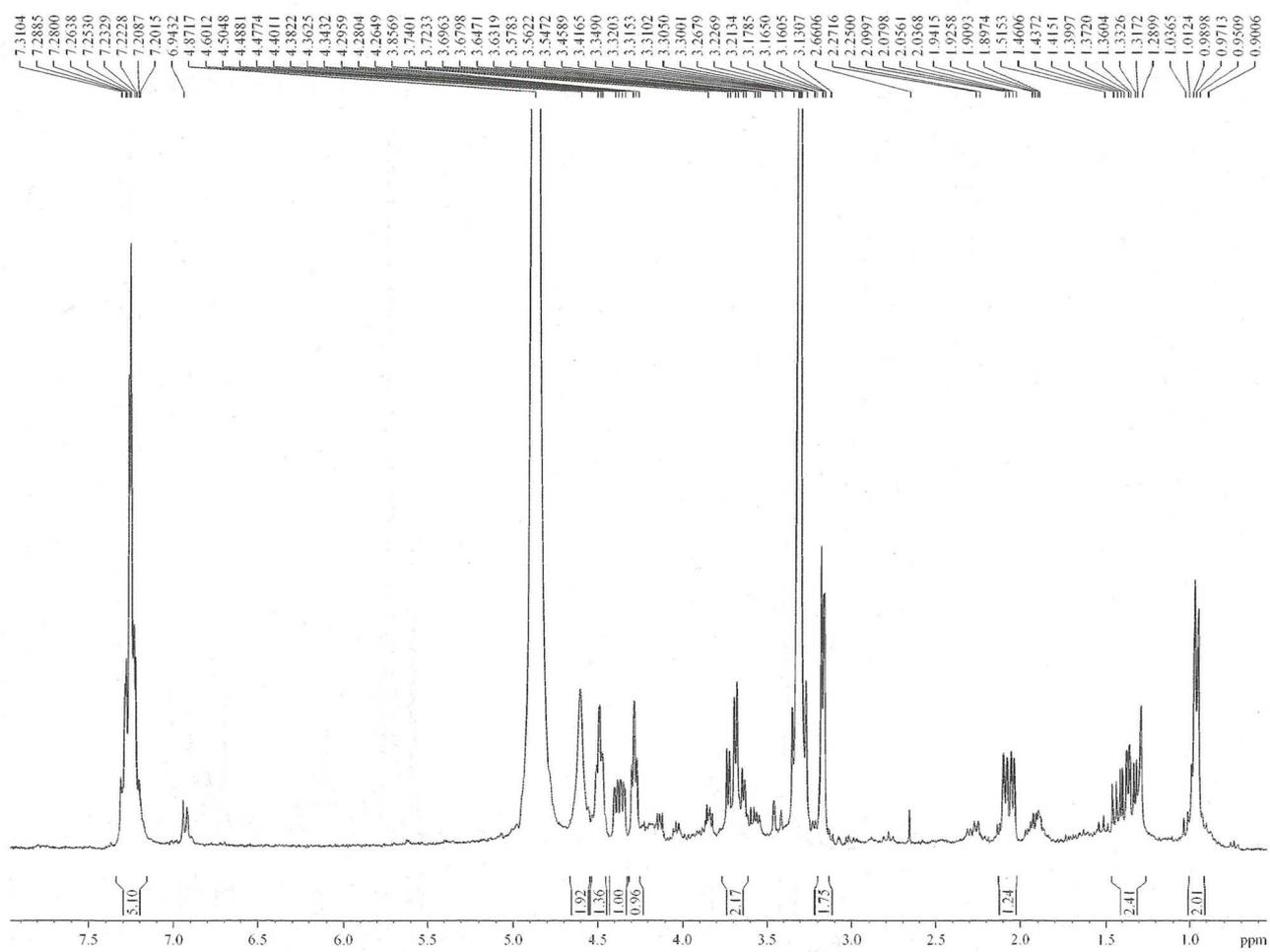
$[M+H]^+ = 578.3334$

$[M+H - H_2O]^+ = 398.2640$

$[M-H]^- = 576.3196$

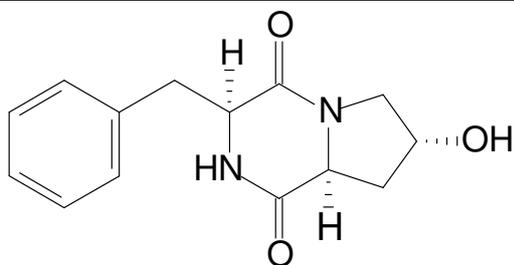


## Anexo III – Material suplementar

Figura 23 – Espectro de  $^1\text{H}$  NMR (MeOD, 300 MHz) da ciclo (Phe-*trans*-4-OH-Pro) (13).

**Anexo III – Material suplementar**

**Figura 24** – Espectro de HRESI-MS e HRESI-MS/MS espectro do composto ciclo (Phe-trans-4-OH-Pro) (**13**): EM no modo de ionização positiva (A), EM/EM no modo de ionização positiva (B) e EM no modo de ionização negativa (C).



Ciclo (Phe-*trans*-4-OH-Pro) (**13**)

$m/z = 260.1160$

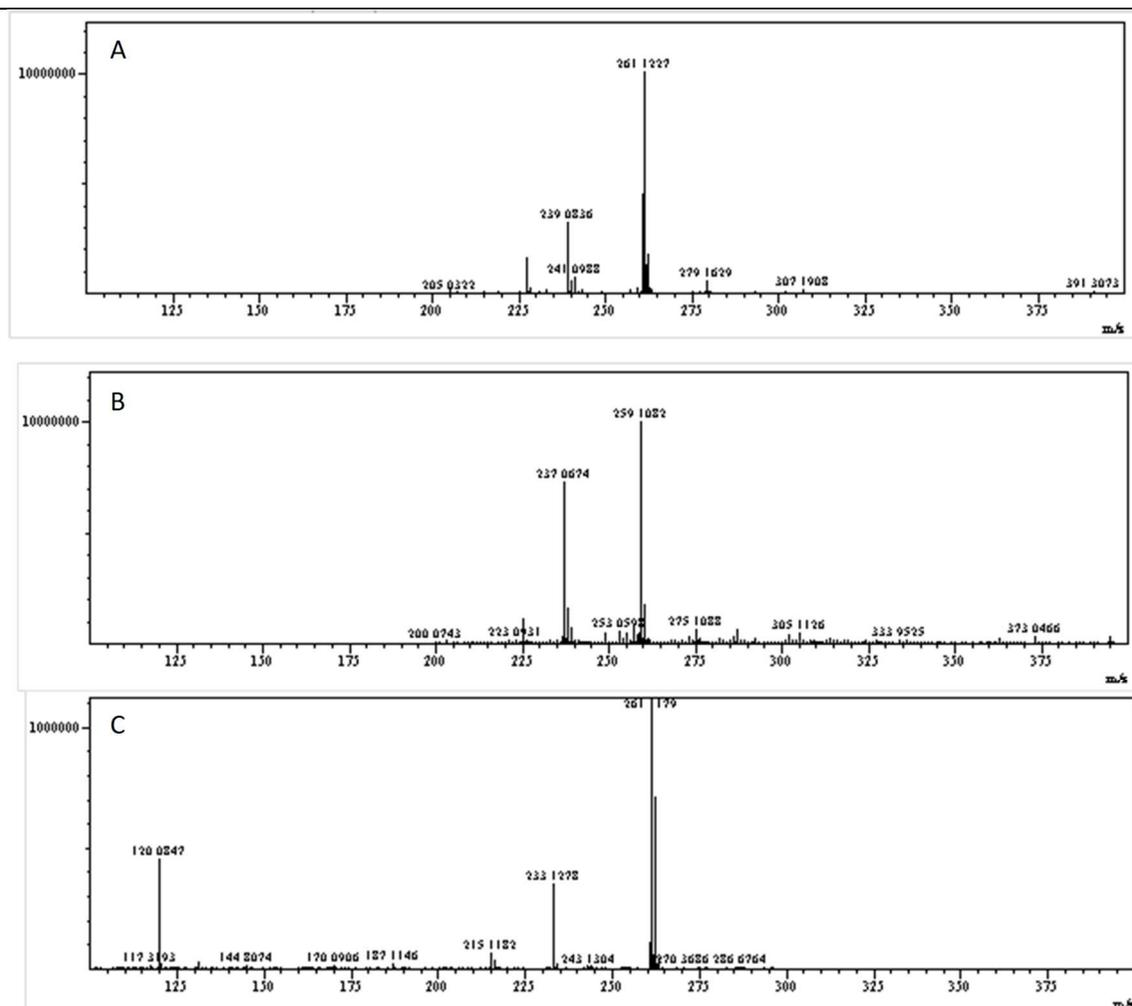
$[M + H]^+ = 261.1227$

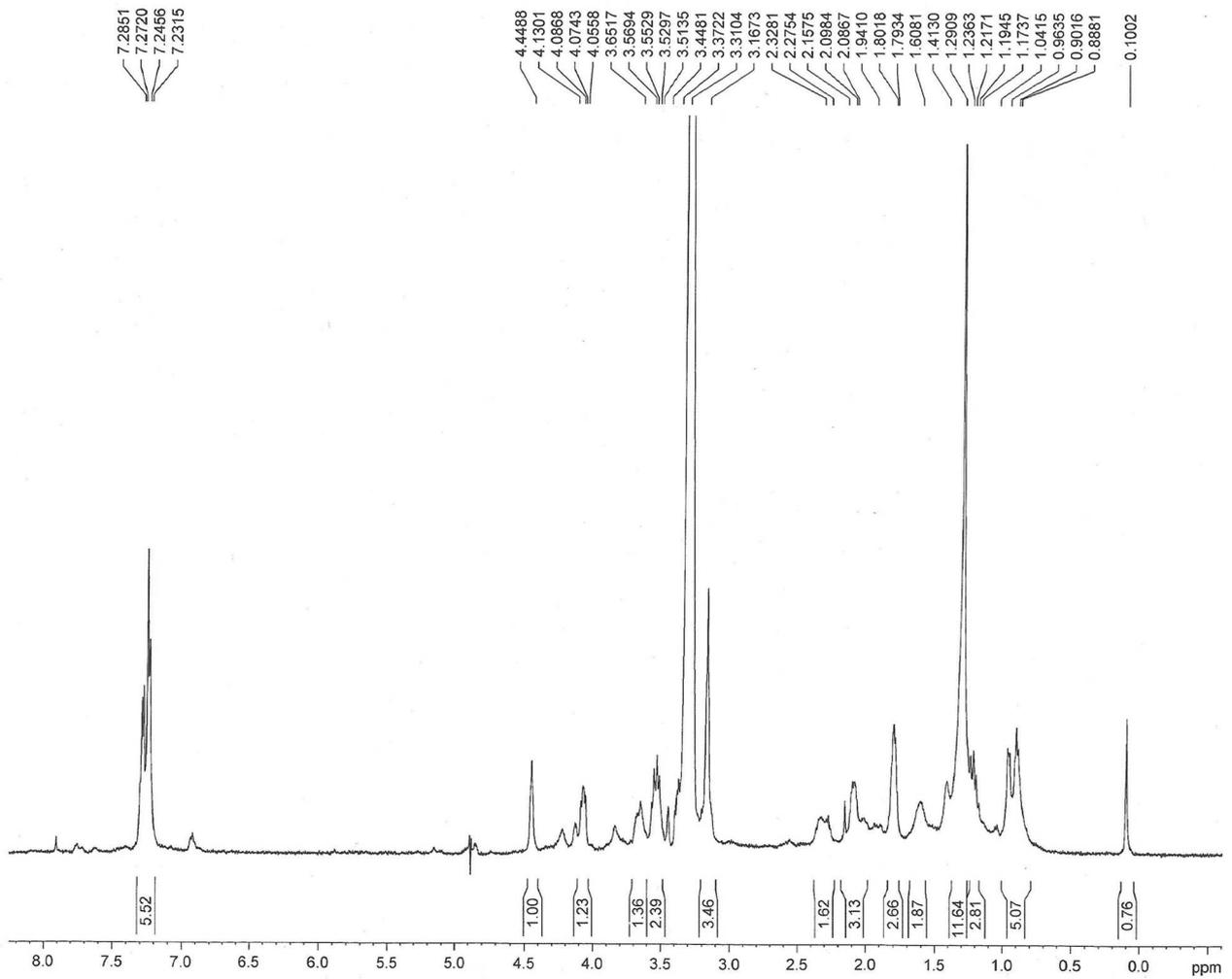
$[M + H - CO]^+ = 233.1271$

$[M + H - Ph]^+ = 170.0906$

$[M + H - C_6H_7NO_3]^+ = 120.0847$

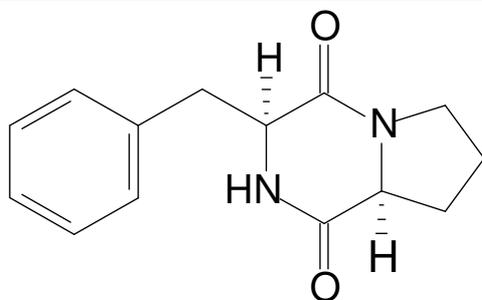
$[M - H]^- = 259.1082$



**Anexo III – Material suplementar****Figura 25 - Espectro de  $^1\text{H}$  NMR (MeOD, 500 MHz) da ciclo (Phe-Pro) (14).**

**Anexo III – Material suplementar**

**Figura 26** – Espectro de HRESI-MS e HRESI-MS/MS do composto ciclo (Phe-Pro) (**14**): em no modo de ionização positiva (A), EM/EM no modo de ionização positiva (B) e em no modo de ionização negativa (C).



Ciclo (Phe-Pro) (**14**)

$$m/z = 244.1213$$

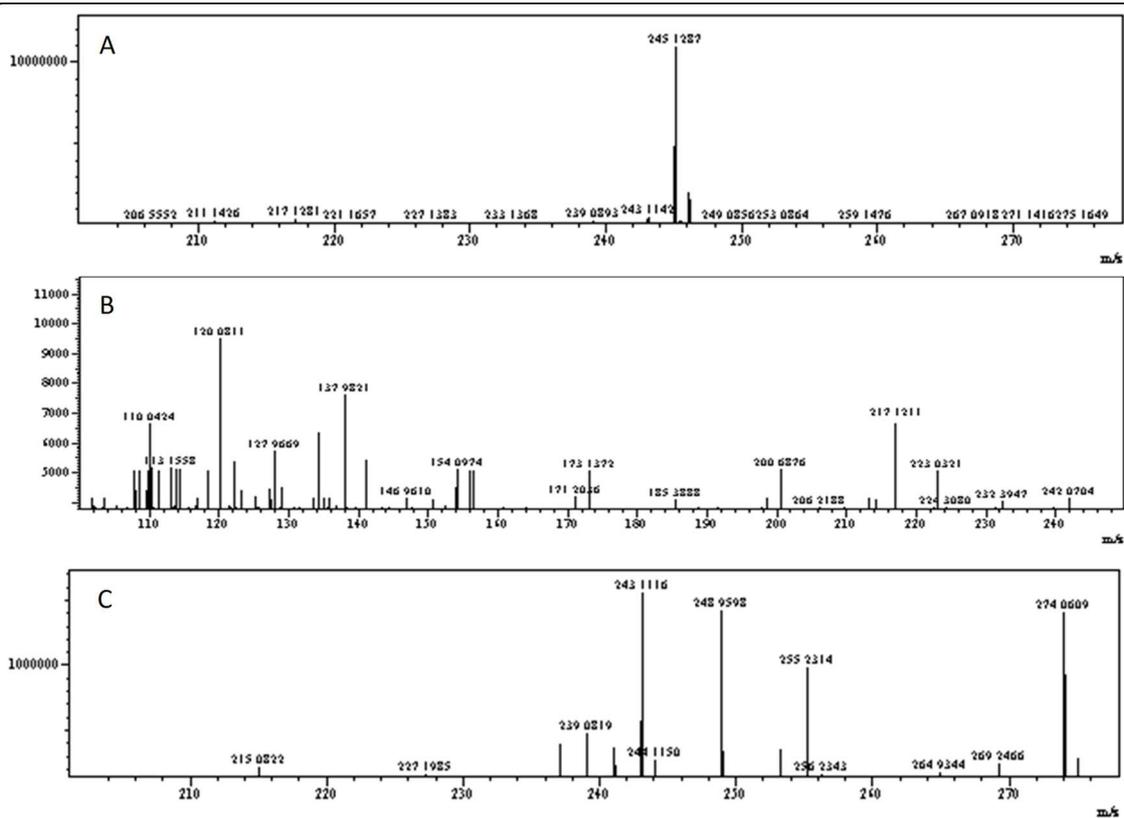
$$[M + H]^+ = 245.1285$$

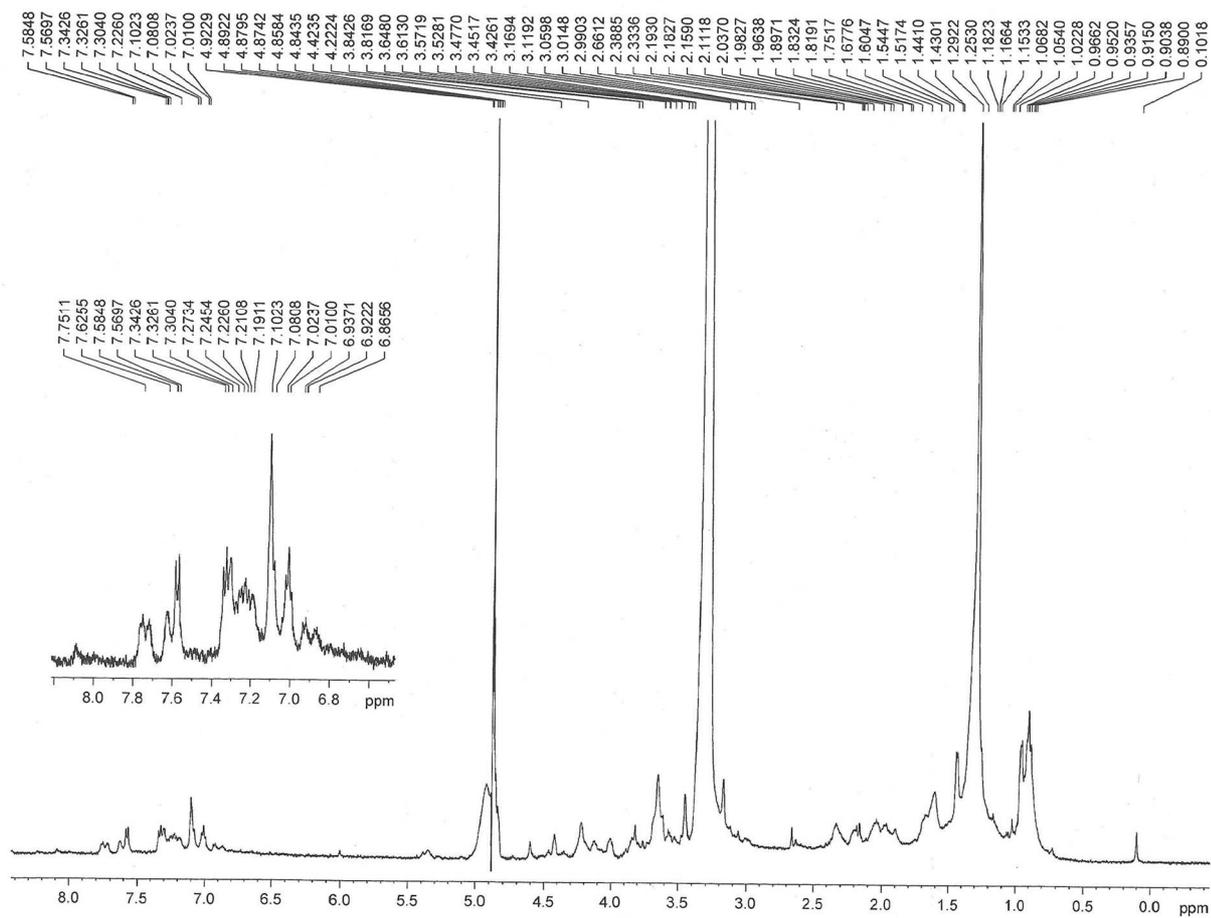
$$[M + H - CO]^+ = 217.1211$$

$$[M + H - Ph]^+ = 154.0974$$

$$[M + H - C_6H_7NO_2]^+ = 120.0811$$

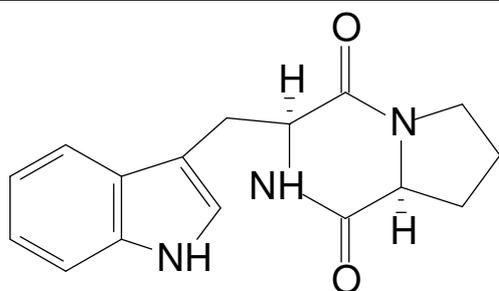
$$[M - H]^- = 243.1120$$



**Anexo III – Material suplementar****Figura 27** - Espectro de  $^1\text{H}$  NMR (MeOD, 500 MHz) da ciclo (Trp-Pro) (15).

**Anexo III – Material suplementar**

**Figura 28** - Espectro de HRESI-MS e HRESI-MS/MS do composto ciclo (Trp-L-Pro) (**15**): EM no modo de ionização positiva (A), EM/EM no modo de ionização positiva (B) e EM no modo de ionização negativa (C).



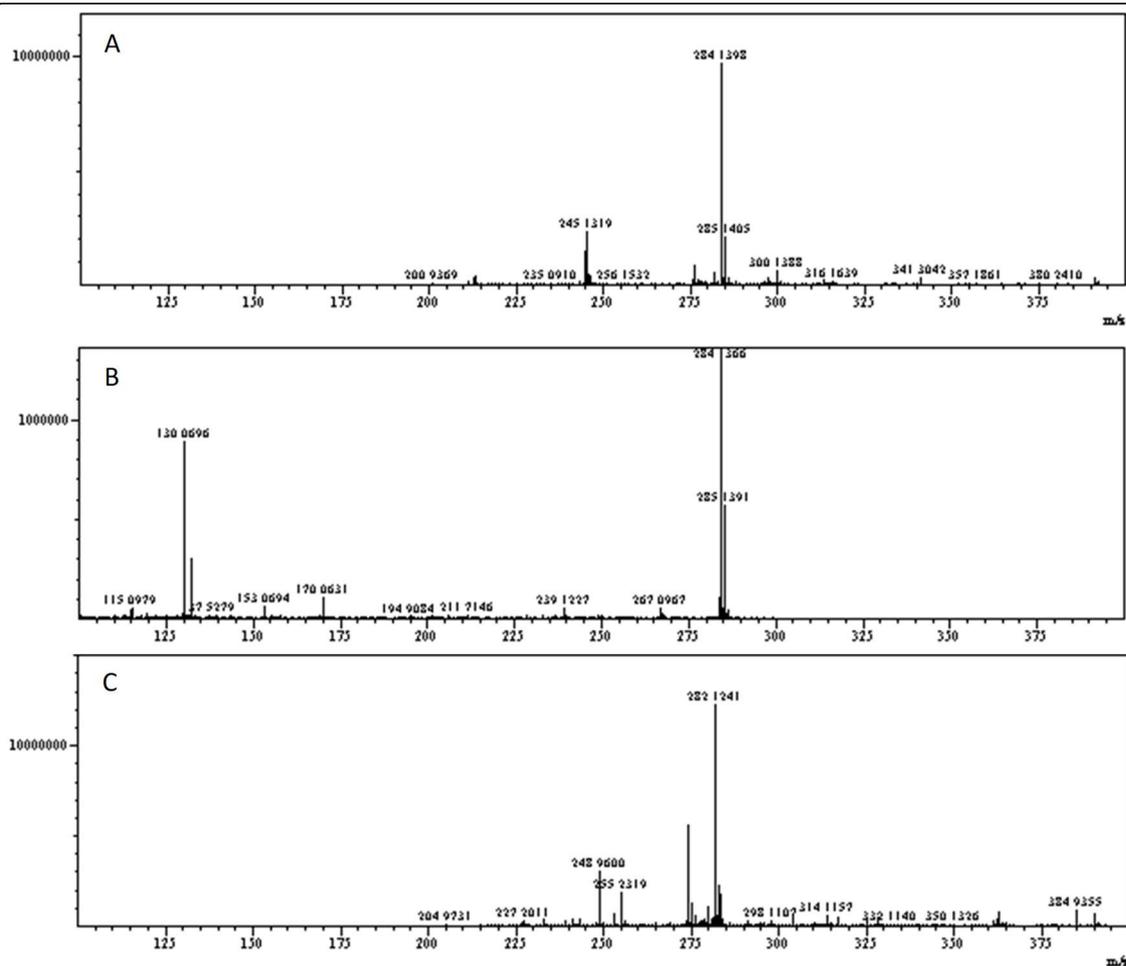
$m/z = 283.1477$

$[M + H]^+ = 284.1398$

$[M + H - C_7H_{10}N_2O_2]^+ = 130.0696$

$[M - H]^- = 282.1241$

Ciclo (Trp-Pro) (**15**)

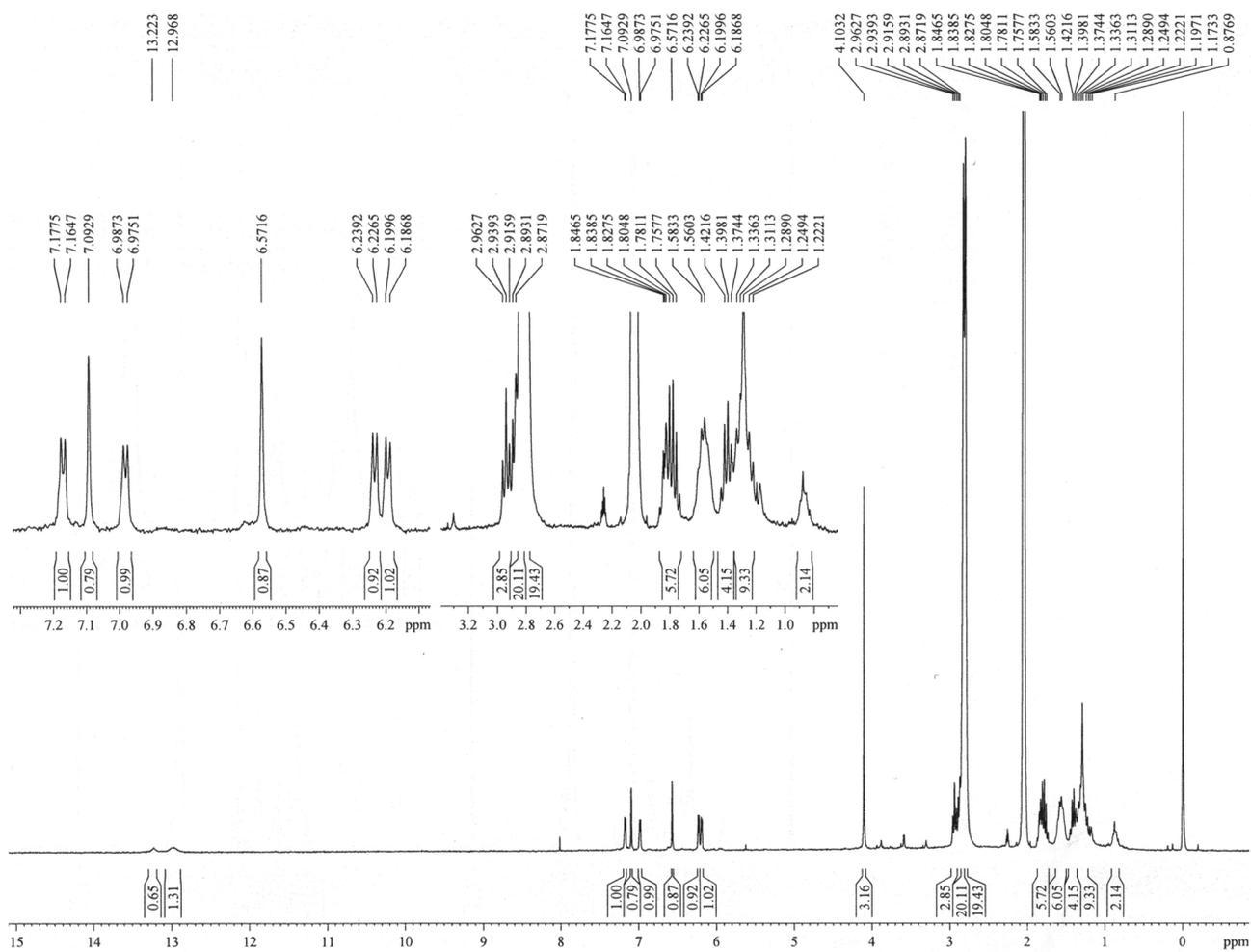


**MATERIAL SUPLEMENTAR 04 – Estudos com a BRA-177 (*Actinomadura* sp.)**

<b>Figura 29</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (MeOD, 500 MHz) da ciclonoilprodigiosina ( <b>16</b> ) -----	127
<b>Figura 30</b>	Espectro de massas de alta resolução (modo positivo) da ciclonoilprodigiosina ( <b>16</b> ): EM ( <b>A</b> ) e EM/EM ( <b>B</b> ) -----	128
<b>Figura 31</b>	Espectro de massas de alta resolução (modo positivo) da nonilprodigiosina ( <b>17</b> ): EM ( <b>A</b> ) e EM/EM ( <b>B</b> ) -----	129

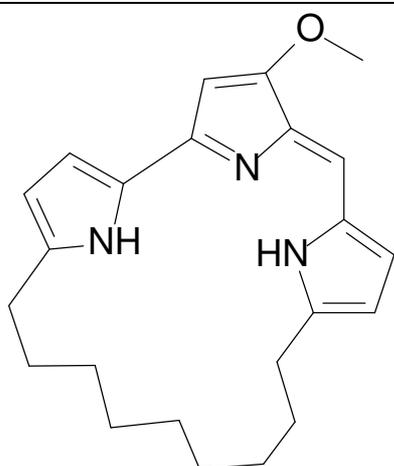
Anexo III – Material suplementar

Figura 29 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (MeOD, 500 MHz) da ciclonilprodigosina (16).



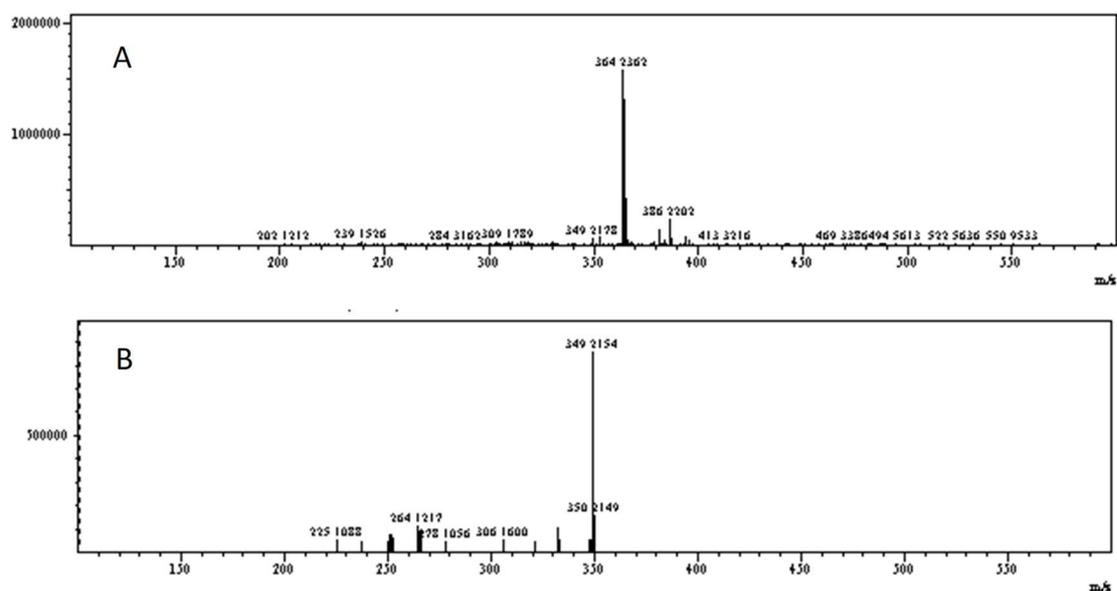
## Anexo III – Material suplementar

**Figura 30** - Espectro de massas de alta resolução (modo positivo) da ciclononilprodigiosina (16): EM (A) e EM/EM (B).



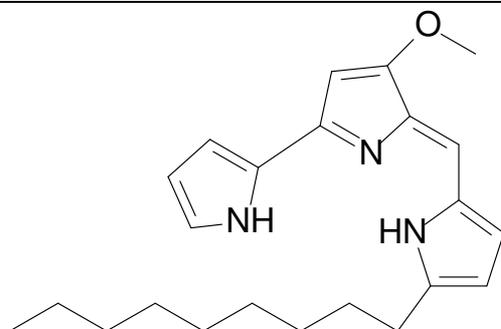
$$m/z = 363,2310$$
$$[M+H]^+ = 364,2362$$
$$[M+H - \cdot CH_3]^+ = 349,2154$$

Ciclononilprodigiosina (16)



## Anexo III – Material suplementar

**Figura 31** - Espectro de massas de alta resolução (modo positivo) da nonilprodigiosina (**17**): EM (A) e EM/EM (B).



Nonilprodigiosina (**17**)

$$m/z = 365,2467$$

$$[M+H]^+ = 366,2517$$

$$[M+H - (CH_2)_7CH_3]^+ = 252,1123$$

$$[M+H - (CH_2)_8CH_3]^+ = 238,0955$$

