**KAREN YADIRA VELASCO ALZATE**

# POTENCIAL ANTICÂNCER DE BACTERIAS ASSOCIADAS A ASCIDIAS, ESPONJAS E SEDIMENTOS COLETADOS NO ATOL DAS ROCAS

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestrado em farmacologia.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profª. Dra. Leticia V. Costa-Lotufo

**KAREN YADIRA VELASCO ALZATE**

# POTENCIAL ANTICÂNCER DE BACTERIAS ASSOCIADAS A ASCIDIAS, ESPONJAS E SEDIMENTOS COLETADOS NO ATOL DAS ROCAS

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestrado em farmacologia.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profª. Dra. Leticia V. Costa-Lotufo

São Paulo

2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Velasco Alzate, Karen Yadira
POTENCIAL ANTICÂNCER DE BACTERIAS ASSOCIADAS A ASCIDIAS, ESPONJAS E SEDIMENTOS COLETADOS NO ATOL DAS ROCAS / Karen Yadira Velasco Alzate; orientador Leticia Veras Costa-Lotufo. -- São Paulo, 2018.
72 p.

Dissertação (Mestrado) ) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Metabolitos secundários. 2. Diversidade microbiana. 3. Metabolômica. 4. Rede Molecular. 5. Bactérias marinhas. I. Costa-Lotufo, Leticia Veras, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato: Karen Yadira Alzate Velasco

Título da Dissertação: **Potencial Anticâncer de bactérias associadas a ascídias, esponjas e sedimentos coletados no Atol das Rocas**

Orientadora: Profª Dra. **Letícia V. Costa-Lotufo**

A Comissão Julgadora do trabalho de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a **...../...../.....**, considerou o (a) candidato (a):

**(  ) Aprovado(a)  (  ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Este trabalho foi realizado sob a orientação da Profª. Dra. Leticia V. Costa-Lotufo, no Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas, com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## AGRADECIMENTOS

À CAPES pelo suporte financeiro e aprovação da minha bolsa, o que permitiu a realização deste trabalho.

À Universidade de São Paulo, ao Instituto de Ciências Biomédicas e ao Departamento de Farmacologia pela oportunidade dada ao me fazer parte desta grandiosa instituição, bem como pelo conhecimento gerado e adquirido em cada aula, disciplina, palestra e corredor.

À professora. Leticia Lotufo, pela oportunidade de me permitir fazer parte de seu grupo de pesquisa, pela orientação e supervisão durante este tempo de mestrado, além de sugestões, correções e o aprendizado cientifico e pessoal brindado que nunca será esquecido. Pela paciência e ajuda, sobre tudo a confiança que foram para mim um forte estímulo e base importante para meu crescimento acadêmico, me permitindo desenvolver habilidades na pesquisa, que com certeza não eram baseadas na ampla experiencia que eu tinha, mas sim, no proposito firme de querer aprender e fazer tudo da melhor forma possível.

À Dra. Anelize Bauermeister, pelas múltiplas ajudas no percurso do meu projeto, pelo acompanhamento e ensinamentos tão valiosos que fizeram parte da minha formação de mestranda, e pela confiança de me permitir colaborar nos seus trabalhos.

À Dra. Paola Branco por sempre ter sido um apoio muito importante na minha estancia no laboratório e no Brasil, sempre ficarei grata pela amizade brindada.

À Dra. Paula Jimenez pela confiança que colocou no meu trabalho, e por me dar a oportunidade de trabalhar com seus alunos de mestrado, uma experiencia extraordinária para min.

À Dra. Paula Rezende pela valiosa colaboração que sempre recebi por parte dela.

À Dra. Eveline Alves pelos múltiplos ensinamentos com a cultura das células e, por ter sempre disposição para me ajudar e resolver dúvidas.

A minha amiga linda Luciana, que foi um grande ensinamento na minha vida. Ela é uma persona extraordinária da qual só com conviver do dia - dia ressalta as melhores qualidades do cientista que o mundo precisa: bondade, responsabilidade, dedicação e honestidade. Muito dos valores que achei na minha orientadora e colegas.

A minha querida Bianca, te agradeço o apoio e a incondicionalidade que você me ofereceu sempre.

Aos professores Dr. Marcelo Pena e Dr. Gabriel Padilla pelas colaborações, ajudas e ensinamentos.

Ao Professor Tito Lotufo, por seus valiosos ensinamentos e contribuições nos nossos trabalhos.

Agradeço de todo coração aos meus amigos e colegas do laboratório LAFARMAR que estão ou estiveram: Larissa, Bianca, Cris, Amanda, Catarina, Helori, Jaime, Gabriel, Gabriela, Anny e Professor Agostinho, pela ajuda na execução desse trabalho; pela disponibilidade; pela troca de conhecimento; pelas sugestões cientificas. Vocês são e serão sempre parte deste trabalho.

Aos meus amigos, que não fizeram parte do meu trabalho acadêmico, mas que contribuíram para meu crescimento pessoal. Sem eles não teria sido fácil lidar com as diferentes dificuldades que a vida oferece. Muito obrigado: Erika, Katerine, Alejandra, Lucas, Vinicius, Luana, Caroline, Carolina, e muitos outros que fizeram parte do meu dia a dia.

À minha mãe e pai que estão sempre presentes em minha vida, sem eles não teria chegado até aqui. A minha mãe que é exemplo de coragem, que me faz acreditar que é possível alcançar os objetivos e a força para nunca desistir da caminhada, muito obrigado por todo o carinho e amor incondicional. Sempre estarei para fazer a vida mais leve, feliz e tranquila para vocês.

Ao meu amor, esposo e companheiro Oscar por todo seu apoio incondicional, tempo de convivência e cuidado, pela paciência e dedicação, por todo o aprendizado e as reflexões, por me mostrar o mundo de uma forma diferente, cheia de amor e harmonia. Obrigada por me fazer sentir especial e amada. Você sempre foi o companheiro que eu quis na minha vida, obrigada mesmo por chegar meu amor, espero sempre comemorar ao seu lado as nossas conquistas.

A o meu país Colômbia, que me deu a oportunidade de me formar, para continuar o caminho acadêmico e ao Brasil por me receber e acolher, o país que sempre levarei no meu coração.

Finalmente, a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente na realização desse trabalho e formação científica. Muito obrigado mesmo.

*“A disciplina é liberdade!”*

Anônimo.

**Potencial Anticâncer de bactérias associadas a ascídias, esponjas e sedimentos coletados no Atol das Rocas.** Dissertação de mestrado de Karen Yadira Alzate Velasco, sob a orientação da Profa. Dra. Leticia Veras Costa Lotufo. Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

## RESUMO

A Reserva Atol das Rocas é um ambiente único no Oceano Atlântico Sul, hospedando um grande número de espécies endêmicas. Os estudos sobre a diversidade química que emerge dessa biota são escassos, mas estima-se uma grande quantidade de novas e complexas estruturas químicas, associadas a diferentes propriedades farmacológicas. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo estudar o potencial farmacológico da microbiota associada a ascídias e esponjas, bem como a partir de sedimentos, coletados no Atol das Rocas. Um total de 80 bactérias foram isoladas e depois cultivadas em cultivo líquido de meio A1 para obtenção de extratos brutos. 38% destes extratos foram considerados citotóxicos (≥ 75% de inibição na concentração de 50 μg/mL) contra a linhagem celular humana de adenocarcinoma do cólon HCT-116 por ensaio de MTT. O sequenciamento do gene 16S rARN revelou que as bactérias produtoras dos extratos citotóxicos são, na grande maioria, da classe Actinobactéria, incluindo: *Streptomyces, Salinispora, Nocardiopsis* e *Brevibacterium*. Em proporção menor, mas não menos importante, foi também encontrado bactérias das classes Bacilli (*Bacillus*) e Proteobacteria (*Pseudomonas e Halomonas*). Todos os extratos brutos foram analisados por HPLC-MS/MS e estes dados foram utilizados para construir uma rede molecular (GNPS) que indicou a presença de uma significativa quimiodiversidade, incluindo: rifamicinas, antimicinas, desferrioxaminas, ferrioxaminas, surfactinas, surugamidas, estaurosporina e saliniketal, além de muitos compostos não identificados. Neste trabalho, também apresentamos a rede molecular como estratégia para destacar os metabólitos responsáveis pela propriedade biológica presente em amostras naturais complexas, com foco em sua identificação. No geral, esses resultados destacaram o grande potencial farmacológico das bactérias do Atol das Rocas no Atlântico.

**Palavras-chave:** Metabolitos secundários; Diversidade microbiana; Metabolômica; Rede Molecular; Bactérias marinhas.

**Anticancer potential of bacteria recovered from ascidians, sponges and sediments collected in Atol das Rocas.** Master's Dissertation of Karen Yadira Alzate Velasco, under the supervision of Profa. Dr. Leticia Veras Costa Lotufo. Graduate Program in Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo.


## ABSTRACT

Rocas Atoll is a unique environment in the South Atlantic Ocean, hosting a large number of endemic species. Studies on the chemical diversity emerging from this biota are scanty, but it is expected a vast number of new and complex chemical structures associated with different pharmacological properties. Therefore, the present work aimed to study the pharmacological potential of the microbiota associated to ascidians and sponges, as well as from sediments, collected at the Rocas Atoll. A total of 80 bacteria were isolated, and then cultured in A1 liquid culture to obtain crude extracts. 38% of these extracts were considered cytotoxic (≥ 75% of inhibition at 50µg/mL) against human colon adenocarcinoma HCT-116 cell lines by MTT assay. 16S rARN gene sequencing revealed that the bacteria producing the cytotoxic extracts are generally from the actinobacteria class, including *Streptomyces*, *Salinispora*, *Nocardiopsis* and *Brevibacterium*. In smaller proportion, but not less important, it was also found bacteria from the classes Bacilli (*Bacillus*) and Proteobacteria (*Pseudomonas* and *Halomonas*). All the crude extracts were analyzed by HPLC-MS/MS and these data were used to construct a molecular networking (GNPS), which indicated the presence of a meaningful chemodiversity, including rifamycins, antimycins, desferrioxamines, ferrioxamines, surfactins, surugamides, staurosporine and saliniketals, despite several unidentified compounds. Herein, we also presented molecular network as a strategy to highlight metabolites responsible for the biological property present in complex natural samples focusing on their identification. Overall, these results highlighted the great pharmacological potential of bacteria from Atlantic Rocas Atoll.



**Keywords**: Secondary metabolites; Microbial diversity; Marine Bacteria; Metabolomics; Molecular network.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Localização de atol das Rocas ..... 22
Figura 2 - Geográfica da reserva biológica Atol das Rocas ..... 27
Figura 3 - Ascídias coletadas Reserva Biológica de Atol das Rocas ..... 28
Figura 4 - Esponjas coletadas Reserva Biológica Atol das Rocas ..... 29
Figura 5 - Passos para obtenção, processamento e avaliação da citotoxicidade dos extratos brutos ..... 31
Figura 6 - Distribuição de todas as amostras por origem ..... 37
Figura 7– Dados de citotoxicidade (%) ..... 38
Figura 8 - Agrupamento dos dados de citotoxicidade (%) relacionado com a origem ..... 39
Figura 9 - Valores de IC50 com ensaio de MTT ..... 40
Figura 10 - Gram de bactérias ativas. ..... 42
Figura 11 – Protocolo de PCR inicial (Ciclos de PCRs 1) ..... 43
Figura 12 - Protocolo de PCR ajustado (Ciclos de PCRs 2) - PCR Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (M0530) ..... 44
Figura 13 - PCR – Eletroforeses - Ensaio preliminar ..... 45
Figura 14 - Padronização do protocolo de PCR. ..... 46
Figura 15 – Agrupamento filogenético das bactérias ..... 48
Figura 16 - Representação esquemática da rede de interações moleculares ..... 50
Figura 17 - Redes moleculares de extratos produzidos por bactérias recuperadas do Atol Rocas ..... 52
Figura 18 - Caraterização dos extratos ..... 55
Figura 19 - Grupo de uma família molecular citotóxica produzida por cepas de *Streptomyces* (BRB-298 e BRB-302) ..... 56
Figura 20 - LC-MS das frações resultantes da BRB 302 ..... 57
Figura 21 - Citotoxicidade das frações da BRB 302 ..... 58

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Protocolo padronizado de PCR com o *GoTaq® Green Master Mix Promega*. .....32
Tabela 2 - Bactérias identificadas com mais de 1300 pb. .....47
Tabela 3 - Bactérias identificadas com menos de 1000 pb.....47
Tabela 4 - Fracionamento do cromatograma. Método e coluna. .....57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---|---|
| **ANVISA** | Agencia Nacional de Vigilância Sanitária |
| **CAPES** | Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior |
| **CNPq** | Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico |
| **FNDCT** | Fundo Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico |
| **SISBIO** | Sistemática Biológica |
| **CGEN** | Compugen Ltd |
| **FDA** | Food and Drug Administration |
| **ZEE** | Zona Econômica Exclusiva |
| **BLAST** | Basic Local Alignment Search Tool |
| **ADN** | Ácido Desoxirribonucleico |
| **ARN** | Ácido Ribonucleico |
| **rARN** | Ácido Ribonucleico ribossomal |
| **PCR** | Reação em Cadeia da Polimerase |
| **C** | Citocina |
| **G** | Guanina |
| **pb** | Pares de bases |
| **CD 30** | Fator de necroses tumoral expressado pelos linfócitos T |
| **MMAE** | Monometilauristatina E |
| **M1 e M2** | Método 1 e Método 2 |
| **TMA** | Traces Metals Agar |
| **SWA** | Sea Water Agar |
| **HCT-116** | Human Colon Cáncer Cell 116 |
| **MTT** | (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) |
| **DMSO** | Dimetil Sulfóxido |
| **$IC_{50}$** | Concentração Inibitória máxima |
| **HPLC** | High-Performance Liquid Chromatography |
| **HPLC-PDA** | HPLC com o detector DAD acoplado |
| **MeOH** | Metanol |
| **AcOEt** | Acetato de etila |
| **DKPs** | Dicetopiperacinas |

## LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|---|---|
| **%** | Porcentagem |
| **N°** | Número |
| **°C** | Grãos centigrados |
| **N** | North |
| **S** | South |
| **E** | East |
| **W** | West |
| **m** | Metro |
| **$cm^2$** | Centímetro quadrado |
| **mm** | Milimetro |
| **Km** | Quilômetro |
| **$Km^2$** | Quilômetro quadrado |
| **m/s** | metro por segundo |
| **mL** | Mililitro |
| **L** | Litro |
| **rpm** | Rotações por minuto |
| **g** | Grama |
| **µg** | Microgramas |
| **mg** | Miligramas |
| **h** | Hora |
| **min** | Minuto |
| **F** | Forward |
| **R** | Revers |
| **V** | Volts |
| **gyr B** | Subunidade Beta da DNA girasse |
| **Por B** | Subunidade Beta da RNA polimerase |
| **UV** | Ultravioleta |
| **MS** | Mass Spectrometers – Espectrometria de massas |
| **RMN** | Ressonância Magnética Nuclear |

## SUMÁRIO


**1 INTRODUÇÃO ..... 15**

1.1 O ambiente marinho e sua diversidade química e biológica ..... 16

1.2 Substâncias derivadas de organismos marinhos e seu potencial farmacológico ..... 17

1.3 Potencial anticâncer das substâncias de origem marinha ..... 19

1.4 Atol das Rocas e suas caraterísticas ecológicas ..... 20

**2 OBJETIVOS ..... 24**

2.1 Objetivo geral ..... 25

2.2 Objetivos específicos ..... 25

**3 MATERIAL E MÉTODOS ..... 26**

3.1 Coleta do material ..... 27

3.2 Plaqueamento das amostras ..... 29

3.3 Isolamento e preservação dos microrganismos ..... 30

3.4 Obtenção dos extratos brutos ..... 30

3.5 Avaliação de citotoxicidade – Teste de MTT ..... 30

3.6 Identificação molecular de linhagens microbianas isoladas cujos extratos brutos apresentaram citotoxicidade ..... 31

3.7 Perfil metabólico dos extratos brutos por HPLC-MS/MS ..... 33

3.8 Rede de interações moleculares *(molecular networking)* ..... 33

3.9 Cultivo em larga escala da bactéria BRB-302 ..... 34

3.10 Análise Estatística dos Resultados ..... 34

**4 RESULTADOS E DISCUSSÃO ..... 36**

4.1 Procedência e citotoxicidade das amostras ..... 37

4.2 Identificação das bactérias ..... 41

4.3 Diversidade química produzidas pelas bactérias – Network molecular ..... 49

4.4 Rede Molecular *versus* citotoxicidade ..... 55

4.5 Famílias moleculares citotóxicas ..... 55

**5 CONCLUSÕES ..... 59**

**REFERÊNCIAS ..... 61**

**ANEXOS ..... 68**

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O ambiente marinho e sua diversidade química e biológica

Os ecossistemas marinhos são reconhecidos como uma fonte de fármacos importantes para a humanidade, com mais de 20.000 moléculas descritas (1). É um ambiente rico em diversidade genética, que se traduz na biossíntese de estruturas químicas únicas e complexas de grande interesse biotecnológico e/ou farmacológico (2, 3). Sendo assim, a farmacologia de produtos naturais marinhos é uma importante linha de estudo, pois tenta elucidar as propriedades farmacológicas de substâncias que estão sendo produzidas pelas diversas espécies de plantas, animais e microrganismos presentes nesse ambiente.

Mais de 70% do planeta Terra é coberto pelos oceanos, que são responsáveis por abrigarem a maior diversidade de espécies descritas (4). Acredita-se que as caraterísticas químicas e biológicas únicas dos oceanos fazem desses ecossistemas singulares e exclusivos nichos ecológicos (5). Nos últimos anos, tem sido descritas mais de 1000 novas moléculas por ano, somente em 2016, 1277 novas substâncias foram descritas em 432 artigos (3). Dos 15.000 produtos naturais descritos até 2010 estima-se que 30% deles foram isolados de esponjas (6). Essa diversidade química surge de uma grande variedade de organismos, como microrganismos, algas, urocordados, esponjas, moluscos, briozoários, cnidários, entre muitos outros. Estes organismos marinhos apresentam características fisiológicas e metabólicas, que muitas vezes refletem a sua história evolutiva, com adaptações únicas para um ambiente de intensas pressões seletivas (1).Tudo isso torna o ambiente marinho muito interessante para ser investigado, a fim de descobrir novas moléculas com promissoras propriedades terapêuticas (5).

Os organismos marinhos podem viver em associação com outros organismos ou microrganismos, como por exemplo bactérias. Essas associações, conhecidas como simbioses, estão relacionadas com as necessidades de cada indivíduo ou em conjunto. Dentre essas relações, existem aquelas mais complexas, envolvendo muitos organismos em sistemas conhecidos como holobiontes, que formam unidades ecológicas compostas geralmente por um macrorganismo e uma infinidade de espécies de microrganismos associadas, coletivamente chamadas de microbioma (7). Curiosamente esse tipo de relação se estabelece desde os organismos mais simples, onde mesmo fungos unicelulares podem ter outras espécies endofíticas, até o homem que abriga em seu organismo uma quantidade de células de microrganismos dez vezes superior às suas próprias células (7 e 8).

Esta íntima relação confere condições biológicas e químicas especificas, que possibilitam o perfeito ajuste do holobionte com o ambiente, afetando no caso dos invertebrados marinhos desde ciclos biogeoquímicos de nutrientes como carbono, nitrogênio e fósforo, até a

adaptabilidade às mudanças ambientais (9). Neste contexto, a produção de moléculas de complexos esqueletos químicos orquestra múltiplas funções nesses sistemas, incluindo àquelas de defesa. E é justamente na expressão do chamado metabolismo secundário que reside a produção de substâncias com importância biotecnológica e farmacológica (10). Entre os organismos mais estudados nessas associações estão as bactérias, as quais são uma importante fonte de substâncias bioativas. Estes microrganismos tem a capacidade de se associar com outros organismos marinhos como esponjas, ascídias, corais, algas e muitos outros, além de ocupar todo o assoalho marinho.

## 1.2 Substâncias derivadas de organismos marinhos e seu potencial farmacológico

Aproximadamente 60% dos fármacos utilizados na clínica são de origem natural especialmente aqueles utilizados para o tratamento ou controle do câncer. Os novos compostos informados em 2016 foram principalmente: monoterpenos, iridóides, sesquiterpenos, diterpenos, sesquiterpenos, triterpenos, meroterpenos, alcalóides, lignanas, cumarinas, flavonas, ciclo peptídeos e policetídeos, onde, a maioria dos novos compostos foram isolados de: plantas, organismos marinhos, fungos, cepas bacterianas e cianobactérias. Alguns dos novos compostos (11), mostraram potencial bioatividade, como: citotoxicidade, efeitos anti-inflamatórios, neuroprotetores e hipoglicemiantes, também efeitos antimicrobianos e anti–tuberculose. Com alguns destes compostos foram feitos teste de citotoxicidade para: malária, HIV e vírus da hepatite B e C, com resultados promissórios. Os dados biológicos informados foram obtidos principalmente em modelos *in vitro* (9, 8).

Entre os organismos marinhos estudados destacam-se as ascídias e as esponjas, que são invertebrados filtradores que podem ser encontrados em todos os ambientes marinhos, incluindo o Atol das Rocas, convivendo com complexas comunidades de microrganismos incluindo *Archaea*, bactérias, e células eucariotas simples que são essenciais para o funcionamento e sobrevivência deles (13). A simbioses entre bactérias e organismos marinhos é bem conhecida e estima-se que em 20 anos de estudo, no caso das ascídias, gerou aproximadamente 580 compostos ativos reportados, dos quais 64% foram produtos anticâncer, seguido de 6% de drogas antimaláricas, entre outras, quando classificados pelo seu uso biomédico. Quando classificadas pelas caraterísticas químicas das substâncias, pode-se observar que 48% são alcaloides indólicos, seguido de alcalóides pirrólicos com 18%, alcalóides $\beta$-carbolínicos com 8% e estaurosporina com 5% (entre outros com menor proporção). Entretanto, estima-se que entre 1994 a 2014 só 5% do total de 3000 espécies de

ascídias conhecidas foram estudadas, destas 32% corresponde à família *Didemnidae*, 22% à *Polyclinidae*, e 11 e 12 % à *Styelidae* e *Polycitoridae*, respetivamente (14).

As esponjas, por sua vez, são os invertebrados mais estudados com relação ao metabolismo secundário, sendo responsáveis, como dito anteriormente, por cerca de 30% das substâncias já isoladas (6). São produzidas pelas esponjas, substâncias com diversas origens químicas e com elevado potencial farmacológico, sobretudo: alcalóides, macrolídeos, terpenóides, poliéteres, derivados de nucleosídeos, e outros compostos orgânicos (8). As esponjas exercem funções ecológicas extraordinárias nos ecossistemas marinhos, resguardando uma grande variedade microrganismos simbiontes, calculando-se que o 40% do volume total das esponjas podem ser ocupadas por estes. Além disso, tem sido proposto que os microrganismos simbiontes estáveis, podem ser herdados e diretamente relacionados com as esponjas progenitoras, como descrito também por Sipkema e Decarlt no 2015 (15). Bactérias associadas a esponjas produzem uma ampla variedade de estruturas químicas, incluindo substâncias antitumorais, com mais de 1000 moléculas no ano 2010 (16).

São variados e diversos os metabolitos procedentes de bactérias em simbioses com ascídias, esponjas ou outros organismos marinhos. Essas bactérias associadas produzem diferentes estruturas químicas, geralmente como resposta de interações (antagônicas ou benéficas) com seu hospedeiro, por conseguinte isso é uma evidente mostra do ilimitado potencial e diversidade dos produtos ativos procedentes de organismos marinhos, ao mesmo tempo que, evidencia que as características simbióticas, biológicas, geomórficas e ambientais são uma importante pressão evolutiva que favorecem a geração por parte dos organismos a este tipo compostos bioativos. (16, 19).

Assim, essa associação de alguns microrganismos na superfície é uma interessante alternativa de novos bioativos, devido a que essas interações estimula à produção e desenvolvimento de aleloquímicos para proteger a superfície do hospedeiro contra a colonização de patógenos em troca de um ambiente rico em nutrientes (18).

Tal relação hospedeiro e microrganismos pode se tornar tão próxima que as vias metabólicas podem ser confundidas quando se tenta descobrir qual organismo produziu determinado metabólito. De fato, estima-se que bactérias e cianobactérias são responsáveis por cerca de 80% das substâncias marinhas (ou derivados) que se encontram em testes clínicos ou que já foram aprovadas como agentes terapêuticos (19).

As actinobacterias marinhas (associadas a organismos marinhos como sedimentos) são as principais produtoras de substâncias biologicamente ativas (20), com interessantes

aplicações terapêuticas maiores que aquelas observadas nas contrapartes terrestres. Elas evoluíram com características estruturais únicas, propriedades fisiológicas e químicas, que permitem a sobrevivência em condições de pressão, salinidade e temperaturas variáveis, que acontecem nos habitats marinhos (21).

## 1.3 Potencial anticâncer das substâncias de origem marinha

O câncer corresponde a um conjunto de doenças onde a proliferação e crescimento celulares fogem aos mecanismos de controle intrínsecos do organismo, manifestando a capacidade de invadir outros tecidos do corpo e fazer metástases (22). Em 2012, estima-se que 14,1 milhões de casos de câncer ocorreram em todo o mundo, sendo que mais da metade dos casos estão em regiões em desenvolvimento (23). É inquestionável que o câncer é um problema de saúde pública, sendo estimado para as próximas décadas, mais de 20 milhões de novos casos (24).

O tratamento do câncer envolve várias opções terapêuticas, mas apesar dos avanços constantes na: detecção, tratamento e prevenção da doença, a mortalidade relacionada a essa doença permanece ainda inaceitavelmente alta (25), sendo um dos maiores desafios para a saúde pública. Apesar da existência de muitos fármacos anticâncer e da eficiência terapêutica de alguns destes ainda não existe um fármaco ideal no tratamento do câncer, isto torna a procura de novos fármacos e alvos terapêuticos relevantes ainda mais necessária (26).

Dentre as substâncias em uso clínico de origem marinha, destacam-se aquelas com uso no tratamento do câncer: citarabina, trabectedina, eribulina e bretuximabe vedotina. Vale ressaltar que, em 2017, todos esses medicamentos já estão licenciados pela ANVISA e autorizados para prescrição e uso no Brasil.

A citarabina A aprovada para uso clínico em 1969 e segue, ainda hoje, amplamente empregada no tratamento de diversos tipos de leucemias, como leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crônica e linfoma não-Hodgkin (8). Essa substância não é um produto natural, mas um análogo sintético de um C-nucleosídeo da esponja *Cryptothethya crypta*, sendo historicamente relatada como o primeiro exemplo de um fármaco marinho comercialmente disponível.

A trabectedina ou Ecteinascidina 743 é um exemplo de alcalóide isolado a partir da ascídia caribenha *Ectenascidia turbinata*, que foi aprovado para uso clínico no tratamento de sarcomas de tecidos moles com o nome Yondelis® (27). Este alcaloide apresenta um mecanismo de ação peculiar, ligando-se covalentemente nas fendas menores do ADN, preferencialmente em domínios ricos em CG, formando dímeros e levando a dobras na fita de ADN (28). A

comercialização do Yondelis® só foi possível com a descoberta de um processo de semisíntese a partir da cianosafracina B, obtida a partir da fermentação da bactéria *Pseudomonas fluorescens* (27).

A Eribulina (Halaven®), análogo sintético da halicondrina A isolado da esponja *Halichondria okadai* , com ação antiproliferativa em linhagens tumorais em ensaios *in vivo* e *in vitro*, atualmente usado no tratamento do câncer de mama e alguns casos de liposarcoma refratários ao tratamento por seus efeitos anti-mitoticos sobre as células deste tipo de tumores (62 e 61).

A bretuximabe vedotina, por sua vez, é um fármaco inovador pois envolve um complexo anticorpo-droga, incluindo a monometilauristatina E (MMAE ou vedotina), um dos derivados sintéticos da dolastatina isolada do molusco gastrópode *Dolabella auricularia* , e o anticorpo dirigido à proteína de membrana CD30, também reconhecida com um marcador tumoral para alguns tipos de linfomas (Doronina et al., 2003; Senter; Sievers, 2012). O uso desse medicamento teve um impacto dramático no tratamento de linfoma de Hodgkin, um tipo de câncer que se distingue pela alta expressão de CD30.

Um outro exemplo interessante é o peptídeo didemnina B isolado inicialmente de *Trididemnum solidum* e posteriormente de outras espécies do mesmo gênero com uma potente atividade antitumoral e antiproliferativa contra câncer de próstata (30). Sua função está associada à inibição da síntese de ARN, ADN e proteína, o que levou esta molécula a avanços em estudos pré-clínicos e clínicos (31). Infelizmente, sua neurotoxicidade levou a interrupção dos testes clínicos com essa substância (32). O ciclo depsipeptídeo aplidina A, análogo da didemnina B encontrado na ascídia *Aplidium albicans,* também apresentou uma forte atividade anticâncer contra o câncer de pulmão, melanoma e câncer de mama. Seu modo de ação envolve várias vias, como a parada do ciclo celular e a inibição da síntese de proteínas, terminando na indução de apoptose de células tumorais (31). Atualmente encontra-se na fase III de testes para o tratamento de mieloma múltiplo, com o nome de Aplidin® (32).

## 1.4 Atol das Rocas e suas caraterísticas ecológicas

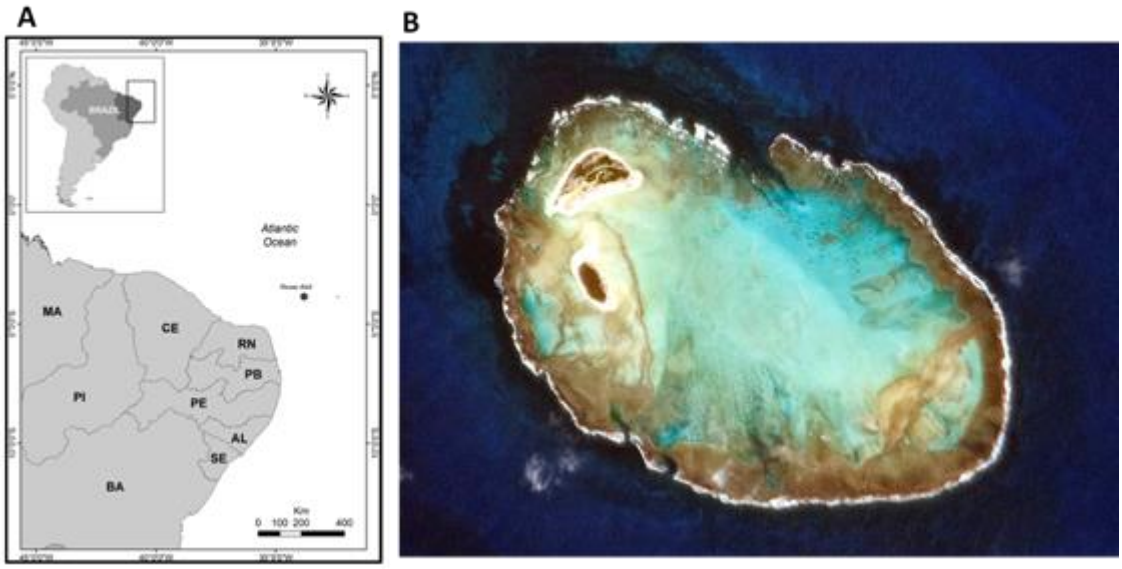
O Brasil possui um litoral marinho com uma extensão aproximada de 8.500km, mais de 3,5 milhões de $km^2$ de zona econômica exclusiva (ZEE) e 2,5 milhões de hectares em regiões com rios desembocando nos mares, misturando-se agua doce com salgada conhecidos como estuários (9, 5), favorecendo a biodiversidade dos ecossistemas e a produção biológica de compostos.

Há que se ressaltar que além da segunda costa contínua mais extensa do mundo, o Brasil possui cinco conjuntos de ilhas oceânicas incluindo: arquipélago de Fernando de Noronha, Trindade e Martim Vaz, Arquipélago de São Pedro e São Paulo, e Atol das Rocas. As ilhas oceânicas brasileiras estão localizadas em mares tropicais, e são, portanto, favoráveis ao desenvolvimento de uma rica e diversificada biota marinha, com vários casos de endemismo (9).

O Atol das Rocas é o único atol no Atlântico, com a exceção de algumas formações semelhantes no caribe colombiano. Um atol é uma ilha oceânica em forma de anel, com formações vulcânicas, de estrutura rochosa de procedência vulcânica e formações coralinas e de outros invertebrados. Estas formações se caracterizam pela presença de uma espécie de piscina interna com pouca troca de água, levando ao desenvolvimento de recifes de corais (34). O Atol das Rocas faz parte de um alinhamento de montes submarinos com 3000 a 5000m de altura desde a superfície oceânica, desenvolvido ao longo da Zona de Fratura de Fernando de Noronha, na dorsal meso-atlântica, formada pela placa Sul-Americana e a placa Africana. A dorsal é uma fenda profunda de 10km que distancia uma placa da outra, que separa o fundo marinho, trazendo mudanças nas espécies marinhas próprias desse ecossistema (12).

O Atol das Rocas encontra-se localizado no sudoeste do Oceano Atlântico a 3° 51′S e 33° 49′W, a 266 km da cidade de Natal, no estado do Rio Grande do Norte, nordeste do Brasil. Tem uma forma elíptica, medindo 3,5 km ao longo do seu eixo principal E-W e 2,5 km ao longo do seu eixo N-S (Figura 1). O recife plano propriamente dito tem uma área total de cerca de 2,62 $km^2$ com uma largura que varia entre 100 e 800m. A superfície plana do recife é composta por associações de gastrópodes de coral, que crescem como cristas lineares com uma elevação de cerca de 2m acima do nível médio da água do mar. Seu contorno é quase contínuo, sendo interrompido por dois canais de maré para o oceano, um situado no Oeste e outro no flanco norte (10, 11).

**Figura 1 -** Localização de atol das Rocas




(A) Mapa mostrando a localização do Atol das Rocas (Fonte: Paiva et al., 2015) (37); (B). Vista aérea do Atol das Rocas (Foto: https://pt.wikipedia.org/wiki/Atol_das_Rocas#/media/File:ESC_large_ISS022_ISS022-E-79937k.JPG).

Esta formação rochosa é banhada pela corrente Equatorial Sul, o vento proveniente do leste-sudeste sopra aproximadamente 45% do ano, com uma velocidade de 6 a 10 m/s em média, com variações de 11 a 15m/s entre junho e agosto (inverno) onde mantem um predomínio de vento do sudeste em 35% dos dias e do leste em 15% dos dias. Entre os meses de dezembro a abril (verão) os ventos do leste sudeste ocorrem em 20% dos dias com velocidades maiores de 20m/s. Igualmente, a temperatura no Atol das Rocas é dependente das estações do ano e podem variar entre 17,5 e 35,8 °C. A precipitação média de chuvas é de 860 mm mensal, e suas águas se caracterizam por seu alto nível de matéria orgânica, turbidez media e temperatura superficial da agua que oscila entre 25,5 e 28 °C (38).

O Atol das Rocas apresenta caraterísticas similares a outras zonas geomórficas bem definidas, constituídas por um recife anterior, uma crista de recifes, um recife plano e uma zona de recifes lagunares (39). Por esse motivo, cada porção que envolve as ilhas que contem esse tipo de características geomórficas está sujeita a condições ambientais únicas, que termina gerando ecossistemas, habitas e comunidades de organismos únicos. Isso somado a fatores físicos, químicos, e biológicos da região induz à variabilidade e a conformações bióticas únicas na biodiversidade de cada zona (40).

Todas estas condições descritas acima tornam este ambiente favorável para a ocorrência de muitas espécies e, consequentemente, uma rica de biodiversidade, sendo que nos últimos

quinze anos, muitas espécies vêm sendo descritas para esse ambiente. Mais recentemente, foram reportadas 12 espécies de ascídias para esse ambiente, sendo 5 delas descritas pela primeira vez: *Ascidia viridina sp*. nov., *Didemnum rochai sp*. nov., *Leptoclinides crocotulus sp.* nov., *Polysyncraton maurizeliae sp*. nov. e *Trididemnum rocasensis sp.* nov (37). Em relação às esponjas calcáreas (41), descreveram a ocorrência de 14 espécies para as ilhas oceânicas e região de abrolhos, sendo 12 delas novas, incluindo *Clathrina lutea*, *Clathrina zelinhae*, *Ernstia citrea*, *Ernstia multispiculata* e *Ernstia rocasensis* para o Atol das Rocas. Esses estudos reforçam o alto grau de endemismo desta região. A grande diversidade de flora e fauna e a constatação que existem poucos, ou quase nenhum, estudos que investigam a diversidade microbiana do Atol das Rocas e o seu potencial farmacológico, tornam esse ambiente de grande interesse para ser investigado.

# 2 OBJETIVOS

## 2.1 Objetivo geral

Investigar o perfil químico e o potencial citotóxico de extratos produzidos por bactérias cultiváveis recuperadas de amostras de ascídias, esponjas e sedimentos coletados no Atol das Rocas.

## 2.2 Objetivos específicos

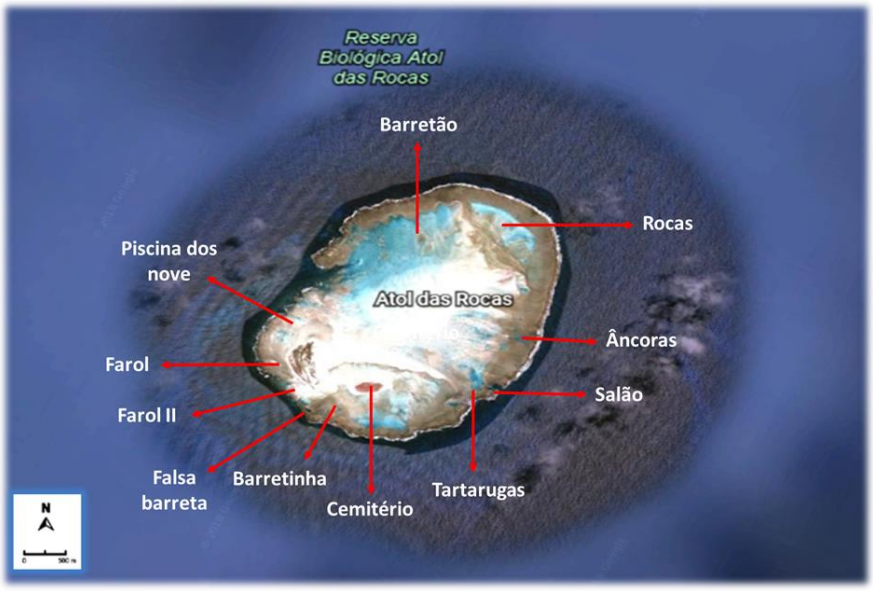
2.2.1. Isolar bactérias cultiváveis associadas a ascídias, esponjas e sedimentos;
2.2.2. Cultivar as bactérias isoladas, seguido de extração dos meios de cultivo com solvente orgânico;
2.2.3. Avaliar o potencial citotóxico dos extratos brutos em células tumorais HCT-116;
3.2.4. Identificar as bactérias produtoras de substâncias citotóxicas por sequenciamento do 16S do ARN ribossomal;
2.2.5. Analisar os extratos brutos por cromatografia líquida de alta eficiência acoplado à espectrometria de massas (HPLC-MS);
2.2.6. Comparar quimicamente os extratos citotóxicos e os não citotóxicos na busca por tendências para extratos citotóxicos;
2.2.7. Identificar metabólitos responsáveis pela citotoxicidade dos extratos brutos empregando o Molecular Networking da plataforma do GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking).

# 3 MATERIAL E MÉTODOS

## 3.1 Coleta do material

As amostras foram coletadas em diferentes pontos do Atol das Rocas (**ANEXO 1**), incluindo: Falsa barreta, Cemitério, Barretina, Piscina dos nove, Cemitério Rocky Shore, Âncoras, Farol II, Tartarugas, Salão e Rocas. Exemplares de ascídias, esponjas e amostras de sedimentos foram coletados de forma manual de acordo com a disponibilidade do material nos pontos citados na Figura 2.

**Figura 2 -** Geográfica da reserva biológica Atol das Rocas

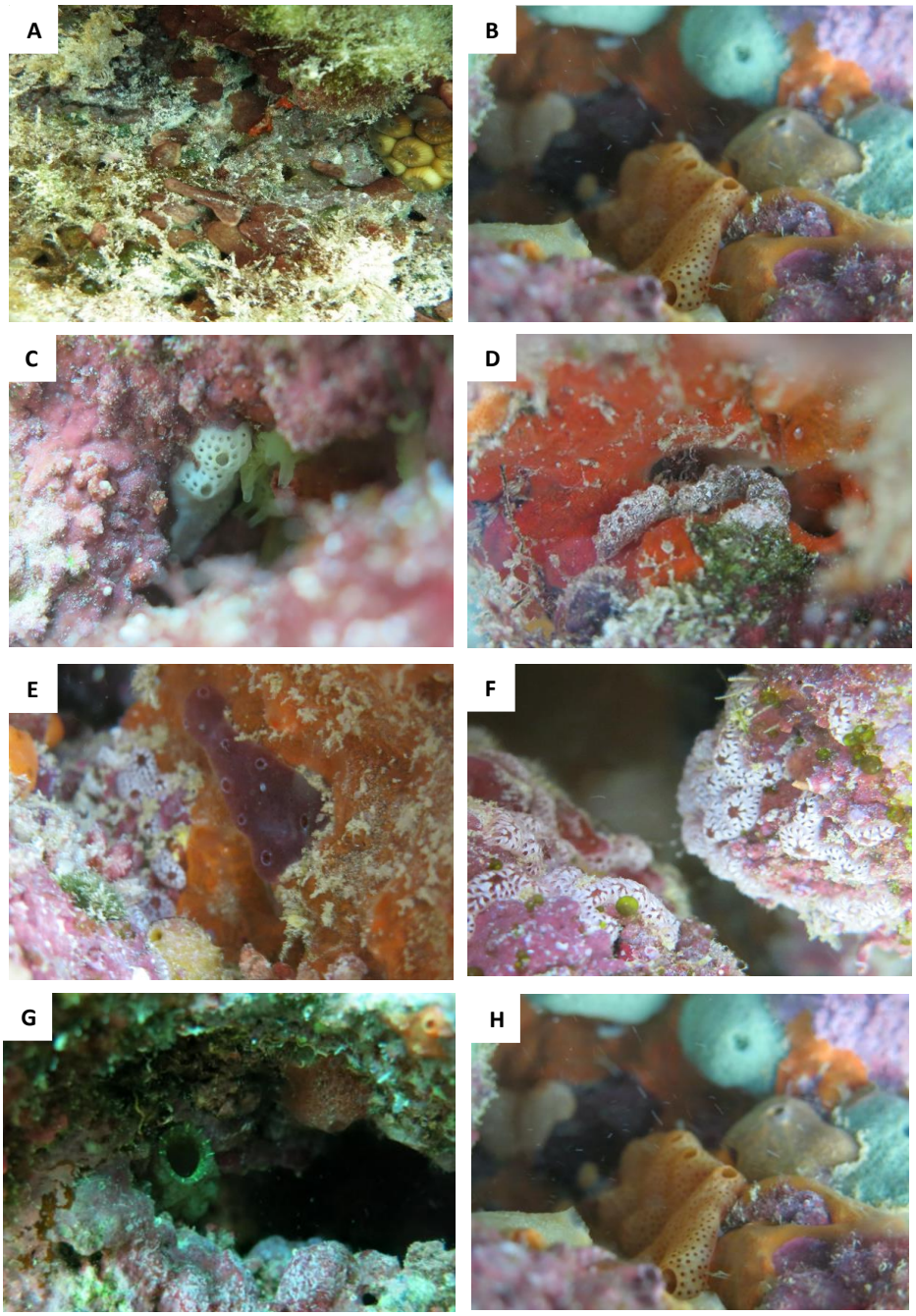



Pontos de coleta no Atol das Rocas. (Desenhado com Google Earth) e completado com os dados e mapas da Helena F. Bouth. *et al*. 2011 (42).

O material coletado foi mantido congelado até o transporte para o laboratório. No laboratório, as amostras foram mergulhadas em etanol 70% para fazer descontaminação da superfície, depois lavadas em água do mar estéril e processadas para o plaqueamento nos meios de cultura. As coletas foram viabilizadas pelo projeto "Prospecção Sustentável em Ilhas Oceânicas: Biodiversidade, Química, Ecologia e Biotecnologia - ProspecMar-Ilhas", Processo: 458548/2013-8, aprovado na Chamada Nº. 62/2013 MCTI/CNPq/FNDCT - Ação Transversal/CT-Aquaviário - Pesquisa e Desenvolvimento em Ilhas Oceânicas. Há que se ressaltar que o projeto tem autorização de coleta do SISBIO (Número: 44435-1), bem como autorização do CGEN (Nº 010170/2015-4).

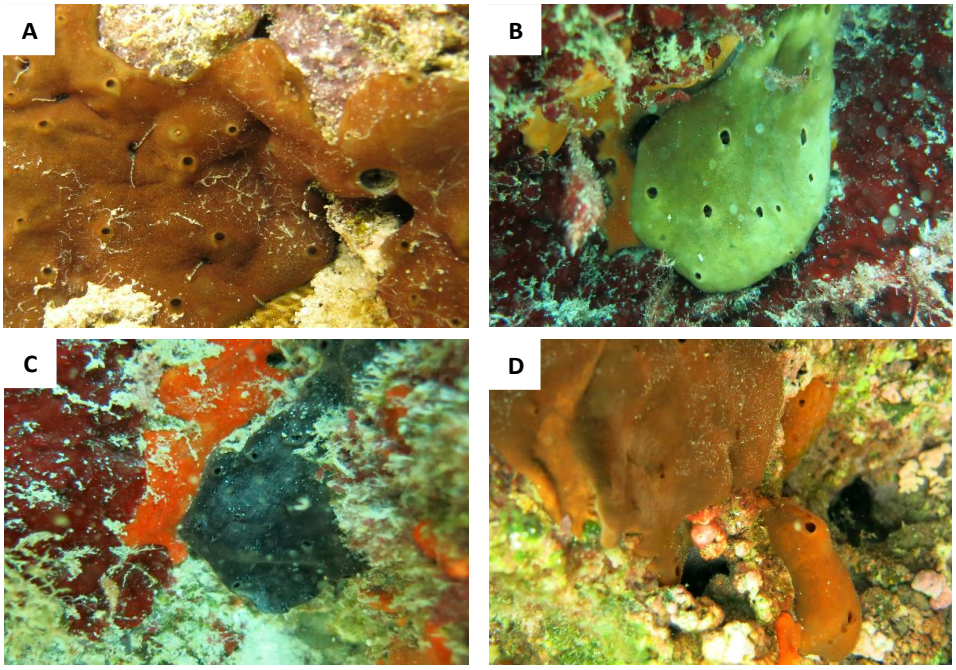
As Figuras 3 e 4 apresentam algumas fotografias das ascídias e esponjas, respectivamente, coletadas no Atol das Rocas e usadas neste trabalho para isolamento de bactérias associadas.

**Figura 3 -** Ascídias coletadas Reserva Biológica de Atol das Rocas




(A) *Trididemnum maragogi*; (B). *Polysyncraton maurizeliae*; (C) *Didemnum granulatum*; (D) Espécie Nova 3; (E) Espécie Nova 1; (F) *Polysyncraton maurizeliae*; (G) Espécie Nova 2; (H) *Ascidia viridina*.

**Figura 4 -** Esponjas coletadas Reserva Biológica Atol das Rocas




(A) *Chondrilla* cf. *nucula*; (B) *Plakortis* sp.; (C) *Plakinastrella microspiculifera*; (D) *Chondrosia collectrix*.

## 3.2 Plaqueamento das amostras

**Método 1 (M1)** – Os sedimentos foram secados em placas de Petri por 12 - 18 horas no fluxo laminar, e, em seguida, carimbados com o auxílio de uma esponja de poliuretano estéril em placas de cultura inoculadas com diferentes meios sólidos (SWA, TMA, A1, detalhados a seguir).

**Método 2 (M2) -** Depois de tratadas e maceradas, ascídias e esponjas foram colocadas em água artificial do mar estéril, e posteriormente aquecidas durante 10 minutos a 55 °C no banho-maria, e inoculadas com auxílio de alça bacteriológica em placas de cultura inoculadas com diferentes meios sólidos (SWA, TMA, A1, detalhados a seguir). Esse procedimento também foi realizado com amostras de sedimentos

As amostras foram inoculadas em três meios de crescimento com ciclohexamida (10µg/mL): meio mínimo (água do mar artificial, SWA), meio A1 (água do mar artificial, peptona, extrato de levedura e amido) e meio minerais traços (TMA), que consiste numa mistura de: Glicose, extrato de levedura, $K_2HPO_4$, $Na_2HPO_4$, $KNO_3$, NaCl, $MgSO_4.7H_2O$ e $CaCl_2.2H_2O$, além de uma solução de metais traços contendo $FeSO_4.7H_2O$, $ZnSO_4.7H_2O$, $MnSO_4.4H_2O$, $CuSO_4.5H_2O$, $CoSO_4.7H_2O$, $H_3BO_3$, $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ em água do mar artificial. Todos os meios são preparados em água do mar reconstituída a 75% e 18% de ágar.

Essas placas foram incubadas em temperatura ambiente até por 5 - 6 meses. As bactérias foram sendo isoladas conforme o surgimento das colônias nas placas.

## 3.3 Isolamento e preservação dos microrganismos

A purificação das linhagens de microrganismos foi realizada por meio de repiques sucessivos, pela técnica de esgotamento por estrias. As diferenças fenotípicas das colônias foram as principais características a ser consideradas para o isolamento (cor, brilho, forma, textura, etc). As colônias foram inoculadas no meio solido A1. Quando as cepas estavam totalmente puras, as colônias foram inoculadas em meio de cultura líquido (A1) (Figura 5). Para conservação das cepas, uma alíquota do meio de crescimento foi suplementado com glicerol 20% (1:1), separado em frascos criogênicos e congelados a -80°C.

## 3.4 Obtenção dos extratos brutos

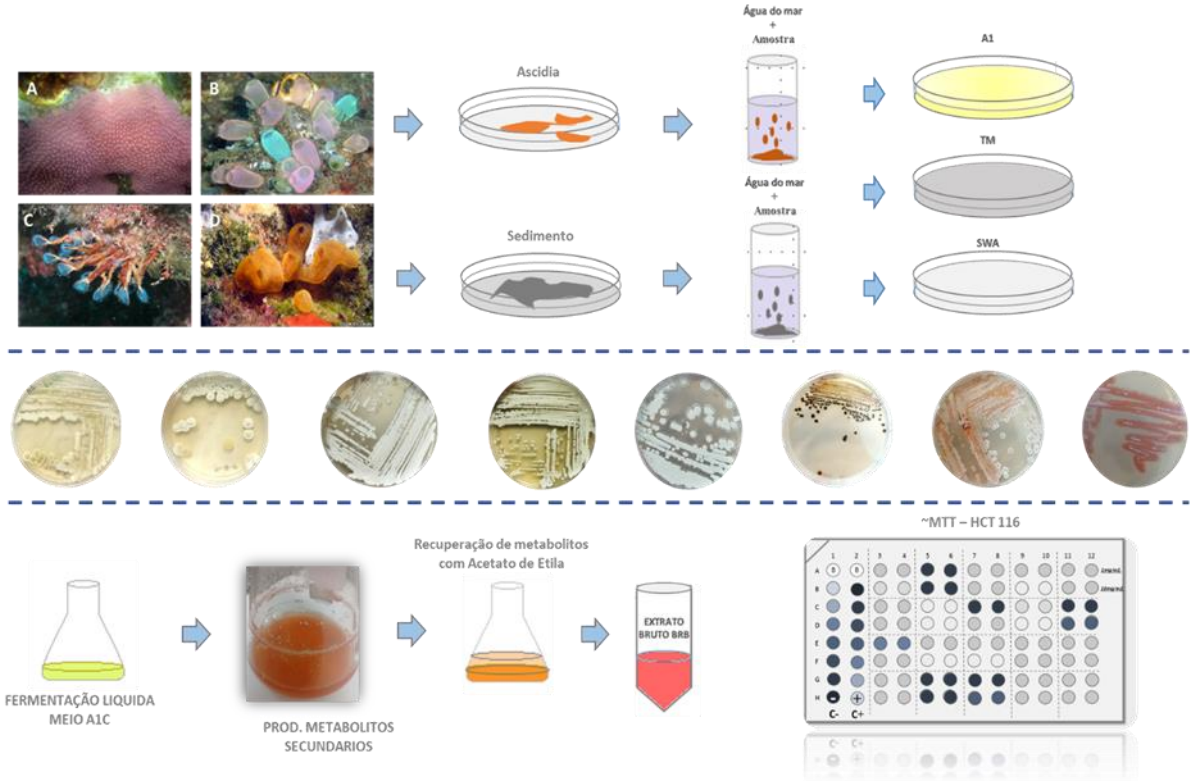
Para obtenção dos extratos brutos, as culturas foram crescidas em frascos tipo Erlenmeyers de 250 mL, contendo 50 mL de meio líquido A1, e colocado em agitação de 3 até 25 dias e mantidos em rotação (160 – 180 rpm) a temperatura ambiente de 28°C. Os metabolitos secundários produzidos pelas bactérias foram extraídos pela adição de 50 mL de acetato de etila no caldo de cultivo e mantido em agitação por 2 horas a 80 rpm. As frações orgânicas foram evaporadas em pressão reduzida para a obtenção do extrato bruto (rotaevaporação).

## 3.5 Avaliação de citotoxicidade – Teste de MTT

Os extratos brutos e as frações da bactéria BRB-302 foram avaliados quanto a sua atividade antiproliferativa numa linhagem de célula tumoral HCT-116 (adenocarcinoma de cólon humano), através do ensaio colorimétrico do MTT em duas concentrações (5 e 50 μg/mL) em duplicata. O ensaio do MTT é quantitativo, indireto, rápido e sensível. Ele permite visualizar principalmente a viabilidade com base no estado metabólico da célula, baseada na redução metabólica do sal 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo) -2,5-difeniltetrazolium bromida (MTT), realizada pelo succinato-desidrogenase na mitocôndria a formazan, de coloração púrpura (43). Os extratos foram solubilizados em DMSO (1 e 10 mg/mL), adicionados no meio de cultura celular (1 μL) e mantidos por 72 horas de incubação (43). As células foram cultivadas e aderidas em garrafas plásticos para cultura (Corning, 25 $cm^2$, utilizando o meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (100 μg/mL de penicilina e estreptomicina), numa estufa a 37°C com atmosfera de $CO_2$ (5%) e umidade (95%). O

crescimento celular foi seguido com o microscópio de inversão a cada 24h. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços nas concentrações de 5 x $10^4$ células/mL, e incubadas durante 72 horas com os extratos. Foram testadas em doses únicas de 5 e 50 µg/mL a fim de selecionar as amostras potencialmente ativas, e as que apresentassem inibição maior ou igual 75% do crescimento celular seriam testadas. A doxorrubicina foi usada como controle positivo (0,2 µg/mL) e DMSO puro como controle negativo.

**Figura 5 -** Passos para obtenção, processamento e avaliação da citotoxicidade dos extratos brutos




3.6 Identificação molecular de linhagens microbianas isoladas cujos extratos brutos apresentaram citotoxicidade

Foram selecionadas as bactérias que apresentaram extratos ativos contra a linhagem HCT-116. Para identificação do gênero das bactérias que produziam extratos citotóxicos, foi isolado o gene 16S rARN, partindo inicialmente da extração do ADN genômico de culturas bacterianas novas (3 a 25 dias de crescimento no meio líquido), utilizando o Kit *Wizard® Genomic DNA Purification* (44) seguindo o protocolo do fabricante com algumas modificações

como: o uso de Proteinase K e aumento da concentração da RNase e o tempo de incubação na extração, como descrito por (45) e (46).

A amplificação do gene 16S rARN foi realizada com *GoTaq® Green Master Mix Promega***,** e primers universais para eubactérias 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3').

O protocolo de PCR usado foi padronizado para este estudo, visto que, nenhum dos protocolos estabelecidos no laboratório funcionaram adequadamente para todas bactérias (Tabela 1).

**Tabela 1 -** Protocolo padronizado de PCR com o *GoTaq® Green Master Mix Promega*.

| COMPONENTES | Reação de 50 µL | Passo | Temperatura | Tempo |
|---|---|---|---|---|
| **GoTaq® Green Master Mix Promega** | 25 µL | Amplificação | 95°C | 2 minutos |
| **Água – livre de nucleasses** | 15 µL | Ciclos (35) | D - 95°C | 1 minuto |
| **Primer F (10 µM)** | 4 µL (para PCR de 50 µL)<br>2 µL (para PCR de 25 µL) | | A - 60°C | 1 minuto |
| **Primer R (10 µM)** | 4 µL (para PCR de 50 µL)<br>2 µL (para PCR de 25 µL) | | E - 72°C | 1 minuto |
| **Amostra** | 2 µL [ 50 ng / mL] | Estabilização | 72°C<br>4°C | 10 minutos |

Os produtos de PCR foram purificados com kit de purificação (QIAGEN Inc., Valencia, CA) e sequenciados pelo *Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células Tronco* da USP, a partir de produtos de PCR, com um sistema de análise de ADN de 48 capilares com a tecnologia *Life Technologies – Applied Biosystems*. As reações de sequenciamento foram feitas utilizando o *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (código 4337456), e corridas em capilares de 36cm utilizando o polímero POP7. As sequências foram analisadas como o *software Sequencing Analysis 5.3.1* usando o Base Caller KB.

As sequências foram editadas usando o software *ChromasPro®* (versão 2.0, TECHNELYSIUM – ADN Sequencing Software – Australia - http://technelysium.com.au/wp/chromaspro/), alinhadas com o *MEGA®* e o *Geneious®*, comparadas com sequências do banco de dados do Ezbiocloud para espécies tipo, e no *NCBI* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) usando *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).*

## 3.7 Perfil metabólico dos extratos brutos por HPLC-MS/MS

Para investigação do conteúdo metabólico todos os extratos brutos foram diluídos em metanol (1,0 mg/mL) e analisados por HPLC-MS/MS. Essas análises foram desenvolvidas em sistema de HPLC (do inglês *High Performance Liquid Chromatography*, CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) (Shimadzu) acoplado ao espectrômetro de massas micrOTOF QII QqTOF (Bruker Daltonics) equipado com fonte de ionização por *electrospray*, operando no modo positivo de ionização. A separação cromatográfica ocorreu em uma coluna Supelco Ascentis Express C18 (5µm, 150 x 3,0mm), usando como fase móvel água (fase A) e acetonitrila (fase B), ambas contendo 0.1% de ácido fórmico. Foi utilizado um gradiente iniciando em 5% até 100% de fase B em 25 minutos seguido de 100% de fase B por mais 6 minutos, com um fluxo contínuo de 0,7 mL/min. O volume de amostra injetado foi 15 µL. A coluna cromatográfica foi mantida a 40°C. As condições utilizadas na fonte de ionização foram as seguintes: cone: 4500 V, voltagem do capilar: 3500 V, temperatura de secagem: 220 °C, gás de secagem: 9.0 L/min, faixa de *m/z*: 50-1500, pressão do gás: 40 psi. Para aquisição dos espectros foi utilizado um método *untarget*, no qual o analisador seleciona para fragmentar os íons de maior intensidade no *scan*. Para fragmentação foi empregado uma rampa de energia de colisão de 20 a 70 eV.

## 3.8 Rede de interações moleculares *(molecular networking)*

Essa análise foi realizada pela Pós-doutoranda Anelize Bauermeister em colaboração com o grupo de pesquisa NPPNS (Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos) do Prof. Norberto Peporine Lopes na Faculdade de Ciências Farmacêuticas em Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo.

Os dados de HPLC-MS/MS foram convertidos para o formato mzXML usando o software MSConvert, e posteriormente, foram carregados para o site do servidor Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) (gnps.ucsd.edu) (47). No GNPS, os espectros de MS/MS foram combinados com o algoritmo do MSCluster, considerando um valor de similaridade de cosseno acima de 0,95, para criação de espectros consensos. Para o agrupamento dos espectros, foi considerado uma tolerância de íon precursor e íon fragmento de 0,08 Da e 0,1 Da, respectivamente. Apenas espectros que apresentaram um valor de cosseno acima de 0,65, mais de 4 íons fragmentos combinados foram agrupados em grupos de moléculas, sendo que apenas os grupos que apresentaram no mínimo dois íons precursores diferentes (nodos) foram considerados na rede de interações. Os espectros também foram buscados nas bibliotecas espectrais do GNPS, considerando valores de cosseno acima de 0,65 e no mínimo quatro íons

fragmentos combinados. A rede de interações (Molecular Network) gerado foi importado e visualizado no software Cytoscape (versões 2.8.2 e 3.4.0) (48) onde os nodos representam os íons precursores, e a largura da linha que ligam os nodos representam a similaridade entre si.

## 3.9 Cultivo em larga escala da bactéria BRB-302

Neste trabalho foi selecionada a cepa BRB-302 para prosseguir com os estudos químicos na busca pelos compostos bioativos. Inicialmente, para obtenção de um pré-inóculo, a bactéria BRB-302 foi cultivada em meio líquido A1 (amido solúvel 10g/L; extrato de levedura 4g/L; peptona 2g/L; sal sintético Red Sea 36g/L; pH ~ 8,0) em temperatura ambiente (mesa agitadora, ~25ºC), sob agitação a 180 rpm durante 3 dias. Em seguida, 2 mL deste cultivo foram transferidos para outros 20 mL de meio A1, sendo cultivado por mais 1 dia (pré-inóculo pronto) nas mesmas condições já descritas. Finalmente, 7,5mL de pré-inóculo foram adicionados em cada frasco de Erlenmeyer de 1,0 L contendo 250mL de meio de cultura. No total, foram obtidos 500 mL de cultivo. Cada cultivo foi extraído por 3 vezes com 150mL de acetato de etila. As frações orgânicas foram secas e reunidas. O extrato seco final (55,0mg) foi dissolvido em 10mL de MeOH/$H_2O$ 2:8 e extraído por 2 vezes com 5 mL de hexano e, em seguida por 2 vezes com 5 mL de AcOEt [etapa realizada para eliminação de ácidos graxos (fase hexânica, 2,6mg) e de sais do meio de cultura (fase aquosa, 30,2mg)]. A fase AcOEt resultante (15,6mg) foi submetida a fracionamento em sistema HPLC-PDA, com fracionamento por cada 1 min de análise cromatográfica. Essa etapa foi realizada em colaboração com o Professor Marcelo Ferreira do Departamento de Botânica no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo juntamente com o pós-doutorando Marcelo Tangerina. Posteriormente, foi feito o ensaio de MTT em células HCT-116, com as frações resultantes do cromatograma.

## 3.10 Análise Estatística dos Resultados

Os dados do MTT de dose única são transformados em percentual de inibição de crescimento, a partir da normalização com os dados dos poços de controle negativo (100% de crescimento) e os dados do branco (0% de crescimento). Para obtenção dos valores de concentração inibitória média ($IC_{50}$) junto com o intervalo de confiança 95%, os dados dos experimentos realizados em concentração crescente foram analisados por regressão não linear e as comparações entre grupos forma feitas por t-test ou Anova através do programa *GraphPad Prisma®*.

Para comparação da diversidade metabólica, foi calculado o índice de diversidade de Shannon-Weiner, baseada na abundância molecular dos íons precursores presentes na Tabela

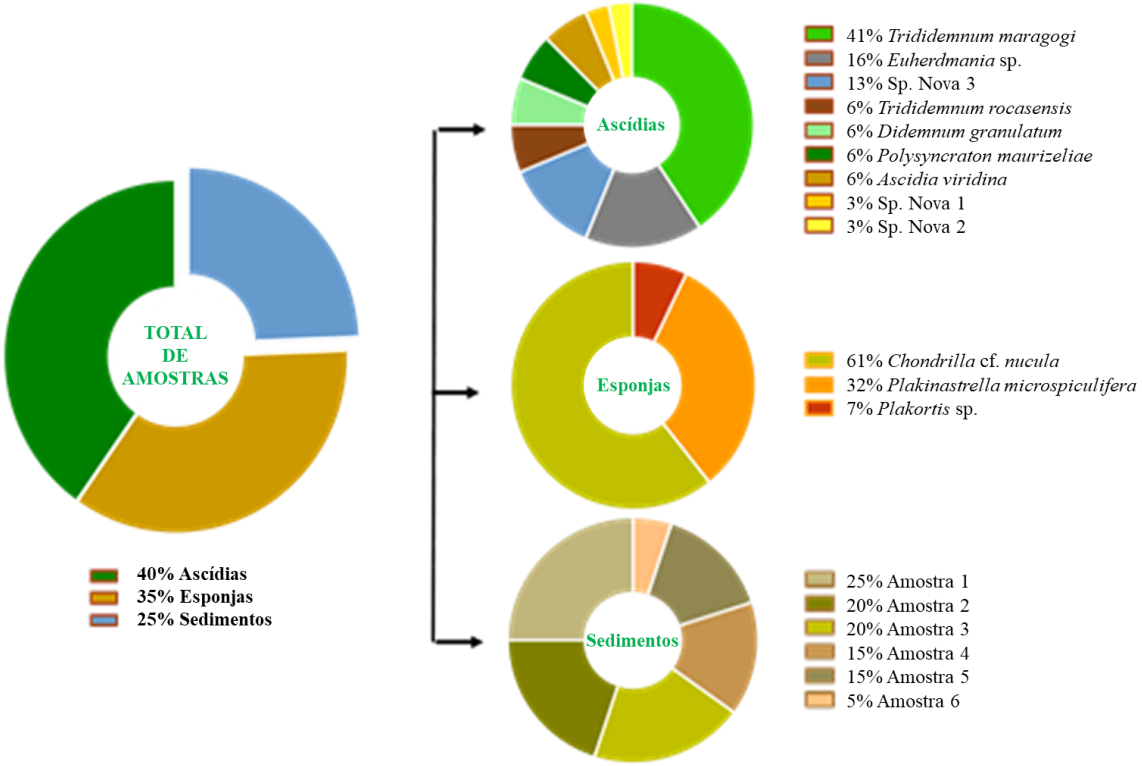
**.csv**, obtida da Rede Molecular resultante. Esse índice foi calculado no software R empregando o pacote 'vegan'.

# 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 4.1 Procedência e citotoxicidade das amostras

Foram isoladas 80 bactérias procedentes de ascídias, esponjas e sedimento do Atol das Rocas. A partir das culturas puras, foram obtidos os extratos brutos em acetato de etila. Esses extratos tiveram suas atividades citotóxicas em células de adenocarcinoma de cólon HCT-116 avaliadas pelo método do MTT (**ANEXO 2**).

**Figura 6 -** Distribuição de todas as amostras por origem



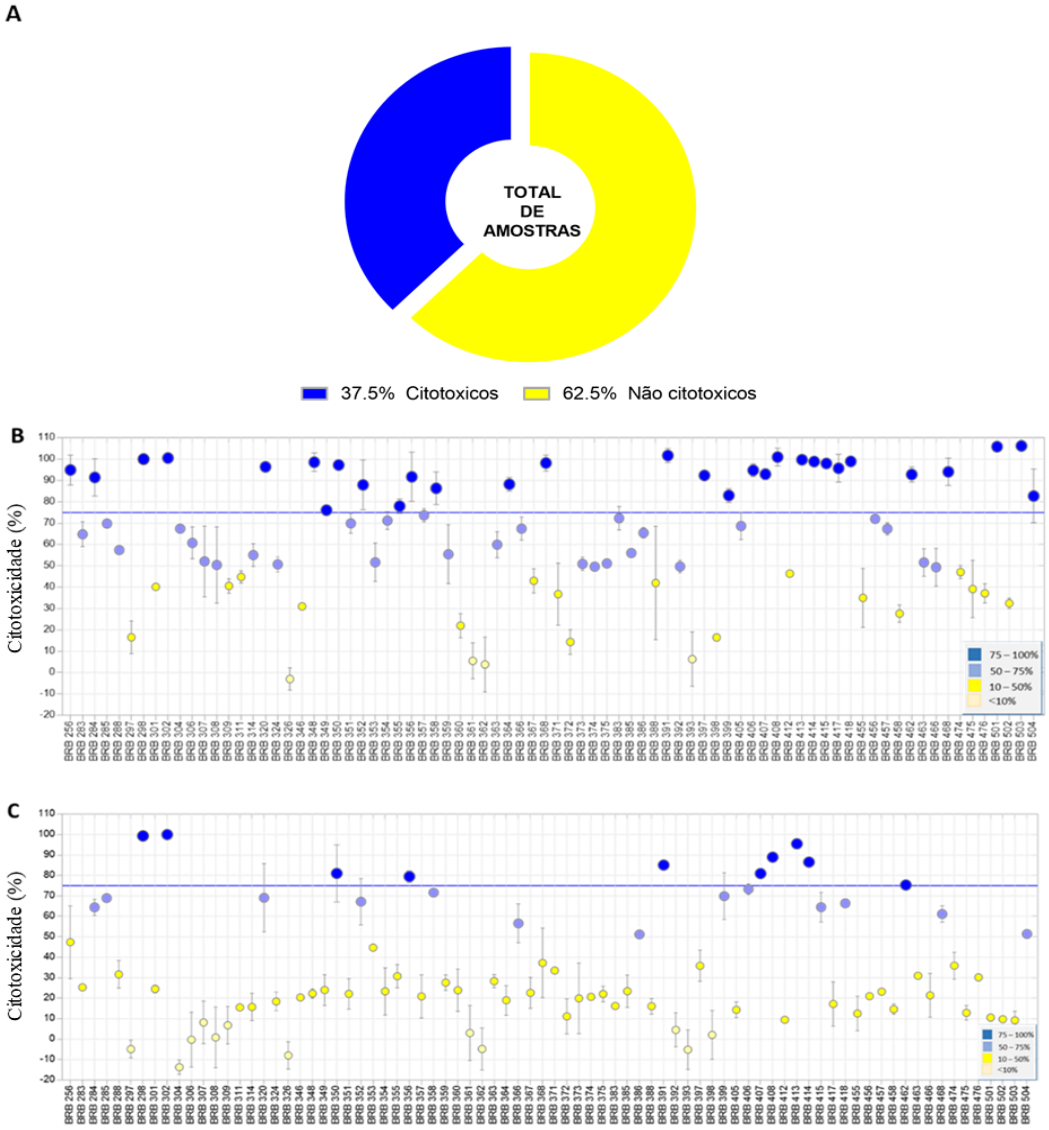

Um total de 80 bactérias isoladas de 3 fontes: ascídias, esponjas e sedimentos.

A maioria das bactérias foram isoladas de ascídias (40%), seguida pelas esponjas (35%) e sedimentos (25%). Em relação às ascídias, onde partimos de um número maior de espécies, isolamos bactérias principalmente da *Trididemnum Maragogi* (46%), seguida pela *Euherdmania* sp. (16%). No caso das esponjas, a maioria dos isolados bacterianos vieram da *Chondrilla* cf. *núcula* (61%), seguido pela *Plakinastrella microspiculifera* (32%). No caso dos sedimentos, o número de isolados não apresentou diferenças com relação ao ponto de coleta, visto que, em todos os pontos foram isoladas quantidades parecidas de bactérias.

Os resultados dos testes de citotoxidade em células HCT-116 com os 80 extratos (nas duas concentrações testadas 5 e 50µg/mL) estão apresentados na Figura 7. 37% dos extratos foram considerados citotóxicos (Figura 7A), ou seja, foram identificados 30 extratos com

atividade citotóxica maior que 75% na concentração de 50µg/mL (maior concentração testada) (Figura 7B). Foram considerados mais promissores 10 extratos, pois apresentaram citotoxicidade também na concentração de 5µg/mL (Figura 7C). Esses resultados mostram que as bactérias recuperadas de amostras do Atol das Rocas produzem extratos promissores com alto poder citotóxico na linhagem tumoral testada (HCT-116).

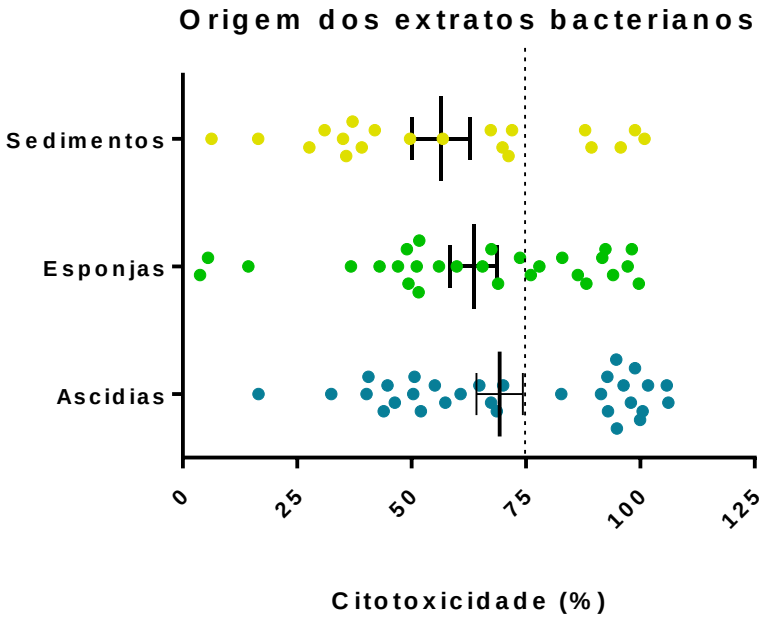
**Figura 7**– Dados de citotoxicidade (%)




Representações dos dados de citotoxicidade maiores e menores ao 75%, diferenciando os dados acima do valor (pontos azuis – acima da linha azul), e os menores (pontos azuis claros e amarelos – embaixo da linha azul). (A) Diagrama apresentando as percentagens das amostras citotóxicas (≥ 75%) e as consideradas não citotóxicas (≤ 75%). (B) Dispersão dos dados das amostras testadas na concentração de 50µg/mL. (C) Dispersão dos dados das amostras testadas na concentração de 5µg/mL.

A Figura 8 apresenta a relação da atividade citotóxica dos extratos de acordo com a origem da bactéria, onde é possível observar que a maioria dos extratos considerados citotóxicos (37,5%) foram produzidos por bactérias recuperadas de ascídias.

**Figura 8 -** Agrupamento dos dados de citotoxicidade (%) relacionado com a origem




Ensaio de MTT com células HCT-116, classificadas pela atividade dos extratos de bactérias derivadas de ascídias, esponjas e sedimentos (testados na concentração de 50µg/mL).

Dos 30 extratos selecionados com atividade citotóxica (37,5%), 14 foram procedentes de ascídias, 11 de esponjas e 5 de sedimentos. De forma geral, os resultados indicam o importante aporte de bactérias marinhas como produtoras de metabólitos com significativa atividade citotóxica. Além disso, esses resultados também destacam as ascídias como uma rica fonte de bactérias com diferenciado metabolismo, uma vez que quase 50% dos extratos ativos foram produzidos por suas bactérias.

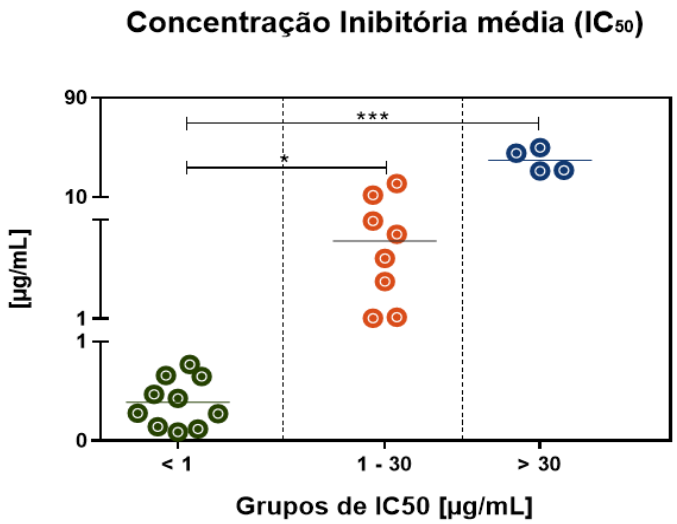
Depois de ter os dados de citotoxicidade, foram feitos os ensaios para cálculo da concentração inibitória dos extratos ($IC_{50}$) em células HCT-116 com os 30 extratos brutos que foram considerados citotóxicos (≥ 75%). Das amostras testadas, 8 delas perderam atividade, que pode ser justificado por degradação das substâncias presentes no extrato devido a exposição à luz, variação de temperatura, incluindo processos de congelamento e descongelamento repetitivos, ou até mesmo possíveis contaminações.

Os dados de $IC_{50}$ dos 22 extratos avaliados foram agrupados em 3 diferentes grupos de acordo com a faixa dos valores obtidos. Esses grupos foram analisados no Prisma com o

Kruskal Wallis para dados não paramétricos, mostrando significância o grupo <1 µg/mL vs 1 - 30 µg/mL e <1 vs >30 µg/mL (medianas diferentes, com valores menores a p<0.05) (Figura 9).

**Figura 9** - Valores de IC50 com ensaio de MTT

A




B

| BRB | IC50 | 95% Intervalo de confianza |
|---|---|---|
| 256 | 1,173 | -0,2519 - 0,3904 |
| 298 | 4.4 | 0,2359 - 1,052 |
| 302 | 0,1439 | -1,663 - -0,02106 |
| 320 | ~ 49,90 | INDETERMINADO |
| 348 | 8.7 | 0,4746 - 1,410 |
| 350 | 0,12 | -1,253 - 0,5517 |
| 352 | 0,65 | -1,165 - 0,765 |
| 355 | ~ 45,68 | INDETERMINADO |
| 356 | 6,5 | 0,6867 - 0,9491 |
| 358 | 0,2785 | -1,018 - -0,09210 |
| 368 | 31,8 | 1,314 - 1,691 |
| 391 | 0,66 | -0,5766 - 0,2238 |
| 397 | 0,43 | -0,6507 - -0,06448 |
| 399 | 0,09 | -1,305´- -0,7049 |
| 406 | 11,72 | 0,87 - 1,268 |
| 407 | 0,2739 | -0,8577 - -0,2669 |
| 413 | 0,77 | 0,09430 - 1,002 |
| 415 | 1,07 | -0,1882 - 0,2499 |
| 418 | ~ 9,999 | INDETERMINADO |
| 462 | 0,47 | -0,5751 - -0,08036 |
| 501 | 31,11 | -0,4823 - 3,522 |
| 503 | 21,13 | 1,042 - 1,608 |

A atividade foi avaliada usando ensaio de MTT com 72h de incubação. Os valores de IC50 (µg/mL) foram obtidos por regressão não linear. (A) Distribuição de dados incorporados em três grupos: IC50 <1, IC50 entre 1 e 30µg/mL e IC50 com valores maiores a 30µg/mL. (B) Valores de IC50 por extrato bruto (BRB).

Num estudo anterior do nosso grupo de pesquisa foram isoladas 268 cepas de bactérias a partir de 21 amostras de sedimentos coletadas no Arquipélago de São Pedro e São Paulo, sendo que 94 delas foram crescidas em meio líquido, e o caldo de cultura extraído com acetato de

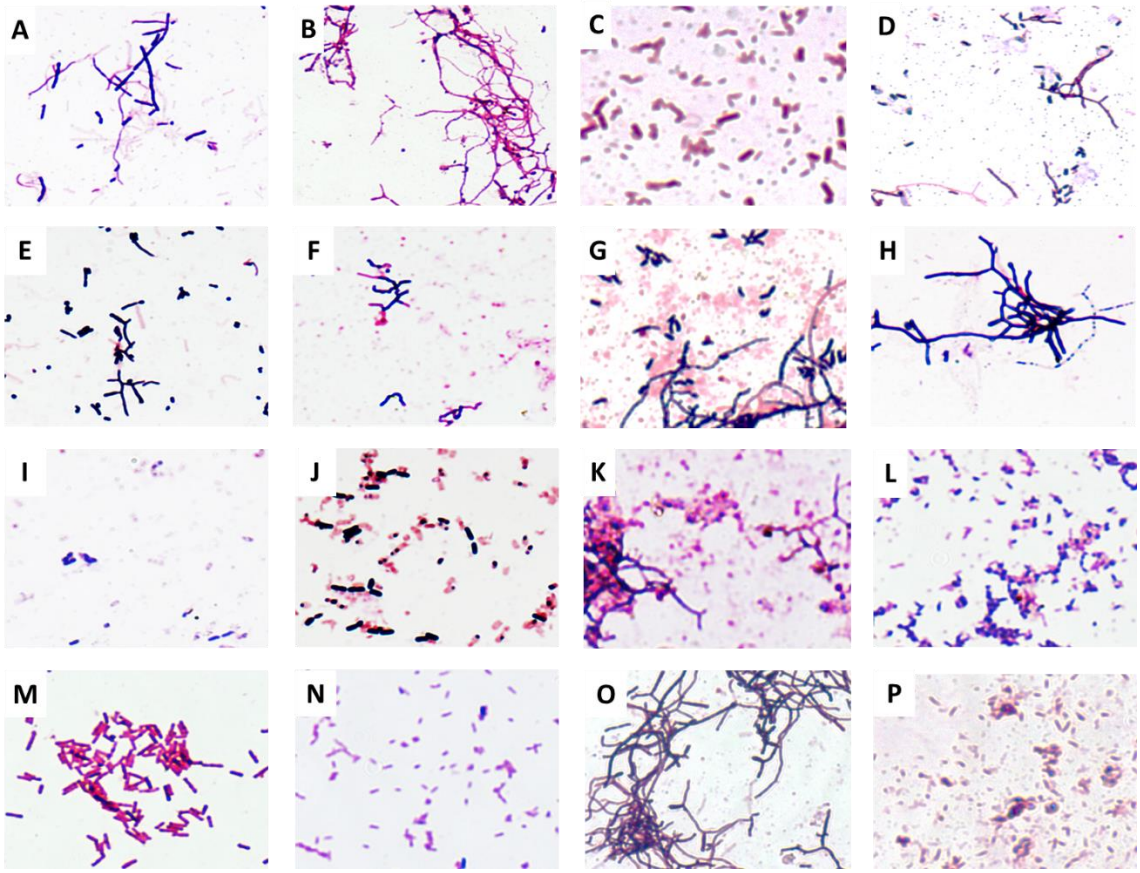
etila, butanol e metanol. Das 94 bactérias isoladas, 26 (28%) produziram extratos citotóxicos com $IC_{50}$ variado de 0,04 a 31,5µg/mL (49), portanto um percentual de espécies ativas ligeiramente menor do que aquele obtido no presente trabalho. Outro estudo conduzido com bactérias isoladas do sedimento do Arquipélago da Madeira em Portugal levou ao isolamento de mais de 400 cepas de actinobacteria, dentre essas, bactérias identificadas como *Streptomyces*, *Micromonospora* e *Salinispora* apresentaram citotoxicidade em células HCT-116 com $IC_{50}$ variando 0,65 a 59,05µg/mL (20). Há que se ressaltar que ascídias e esponjas tem sido relatada como fontes de bactérias bioativas incluindo bactérias dos gêneros, *Streptromyces*, *Micromonospora* e *Salinispora*, dentre outros (50 e 51).

## 4.2 Identificação das bactérias

Para iniciar a identificação das bactérias foi feita uma análise fenotípica, que inclui a morfologia da colônia bacteriana e a coloração de Gram (Figura 10). Além disso, para os estudos taxonômicos ou de filogenia em distintos gêneros e espécies bacterianas tem sido utilizada como técnicas moleculares de uma ampla variedade de genes. No presente trabalho, foi analisado o gene ARN ribossomal 16S, possibilitando através de comparações em bancos de dados a identificação de gênero nas bactérias.

Em seguida são apresentadas as imagens de Gram de algumas amostras isoladas com atividade citotóxica ≥75%. O Gram foi feito principalmente como controle de qualidade do isolamento das bactérias.

**Figura 10 -** Gram de bactérias ativas.

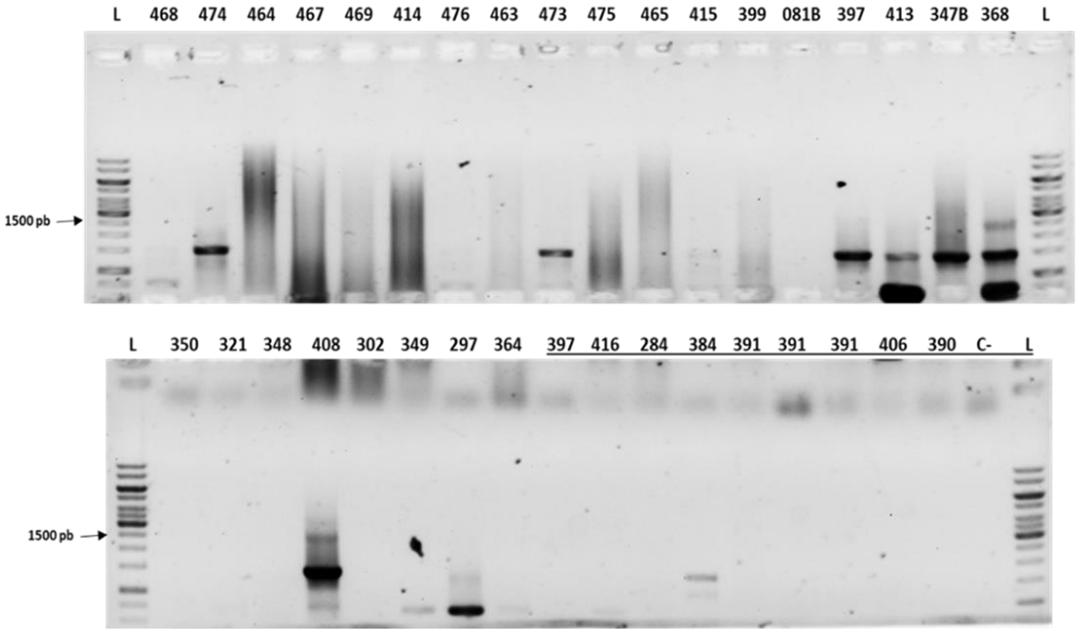



(A). BRB 298; (B). BRB 347 (C). BRB 348; (D). BRB 349; (E). BRB 350; (F). BRB 352; (G). BRB 355; (H). BRB 356; (I). BRB 397; (J). BRB 408; (K). BRB 414; (L). BRB 413; (M). BRB 416; (N). BRB 455; (O). BRB 464; (P). BRB 467.

Para a obtenção do ADN, utilizando o kit da ***Wizard*®,** as modificações anteriormente descritas na metodologia foram feitas para a extração das cepas bacterianas, que apresentaram atividade citotóxica maior ao 75% em seus extratos. Após da extração, começou-se com a padronização do protocolo da PCR ICB (ADN gene 16S), a qual teve que ser ajustada devido à ausência da banda de interesse após PCR, com o protocolo do Laboratório de Microbiologia (Figura 11).

**Figura 11** – Protocolo de PCR inicial (Ciclos de PCRs 1)

**A**




**B**

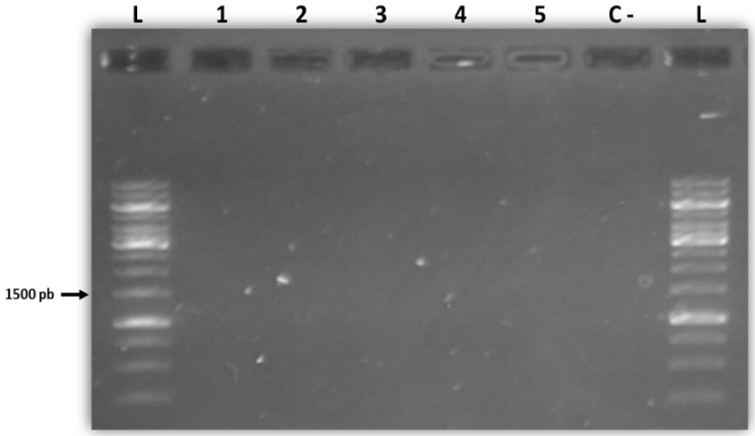
| COMPONENTES | Reação de 50 µL | Passo | Temperatura | Tempo |
|---|---|---|---|---|
| GoTaq® Green Master Mix Promega | 25 µL | Amplificação | 95°C | 2 minutos |
| Água – livre de nucleasses | 15 µL | Ciclos (35) | D - 95°C | 1 minuto |
| Primer F (10 µM) | 1.5 µL (para PCR de 25 µL) | | A - 65°C | 30 segundos |
| Primer R (10 µM) | 1.5 µL (para PCR de 25 µL) | | E - 72°C | 1 minuto |
| Amostra | 1 µL [ 50 - 100 ng / mL] | Estabilização | 72°C<br>4°C | 10 minutos |

(A) Eletroforese de PCR feita com o protocolo A; (B) Protocolo A.

Outros experimentos foram realizados, usando enzimas de alta fidelidade, obtendo os resultados mostrados na Figura 12.

**Figura 12** - Protocolo de PCR ajustado (Ciclos de PCRs 2) - PCR Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (M0530)

**A**




**B**

| COMPONENTES | Reação de 20 µL | Passo | Temperatura | Tempo |
|---|---|---|---|---|
| Água – libre de nucleasses | Variável | Amplificação | 98°C | 30s |
| HF Phusion 5X | 4 µL | | | |
| dNTPs (10 mM) | 0,4 µL | | D - 98°C | 10s |
| Primer F (10 µM) | 1 µL | Ciclos (35) | A - 72°C | 30s |
| Primer R (10 µM) | 1 µL | | E - 72°C | 30s |
| Amostra | Variável | | | |
| DMSO | 0,6 µL | Estabilização | 72°C | 10s |
| Polimerase DNA Phusion | 0,2 µL | | 4°C | |

(A) Gel de eletroforeses mostrando a amplificação com o novo protocolo. (B) condiciones da máster mix e das temperaturas do protocolo de PCR 2.

Foram feitos inúmeros ensaios de PCR, devido à ausência de amplificação do gene 16S rARN nas bactérias analisadas, então começou-se todas as possíveis alterações no protocolo, mudando a quantidade dos reagentes como os tempos e as condições da PCR, tendo claro a diversidade entre as bacterias e que a maioria poderiam ser actinobacterias.

Depois de não ter conseguido resultados, foi necessário fazer 3 protocolos de PCR com mudanças nas temperaturas de anelamento, que foram chamados P1: quando a temperatura de anelamento é 60°C, P2: quando a temperatura de anelamento é 62°C e P3: quando a temperatura de anelamento é 65°C (Figura 13). Os outros parâmetros de temperatura e tempo foram conservados. Cada um dos protocolos foi realizado com uma amostra selecionada (amostra selecionada amplificou uma banda leve de 1500 pb e uma banda inespecífica em 750 pb, no protocolo de amplificação).

A amostra foi colocada em cada um dos protocolos nas seguintes condições para um volume final de 25 µL de reação:

1,5 µL de cada Primer (Forward e Reverse)

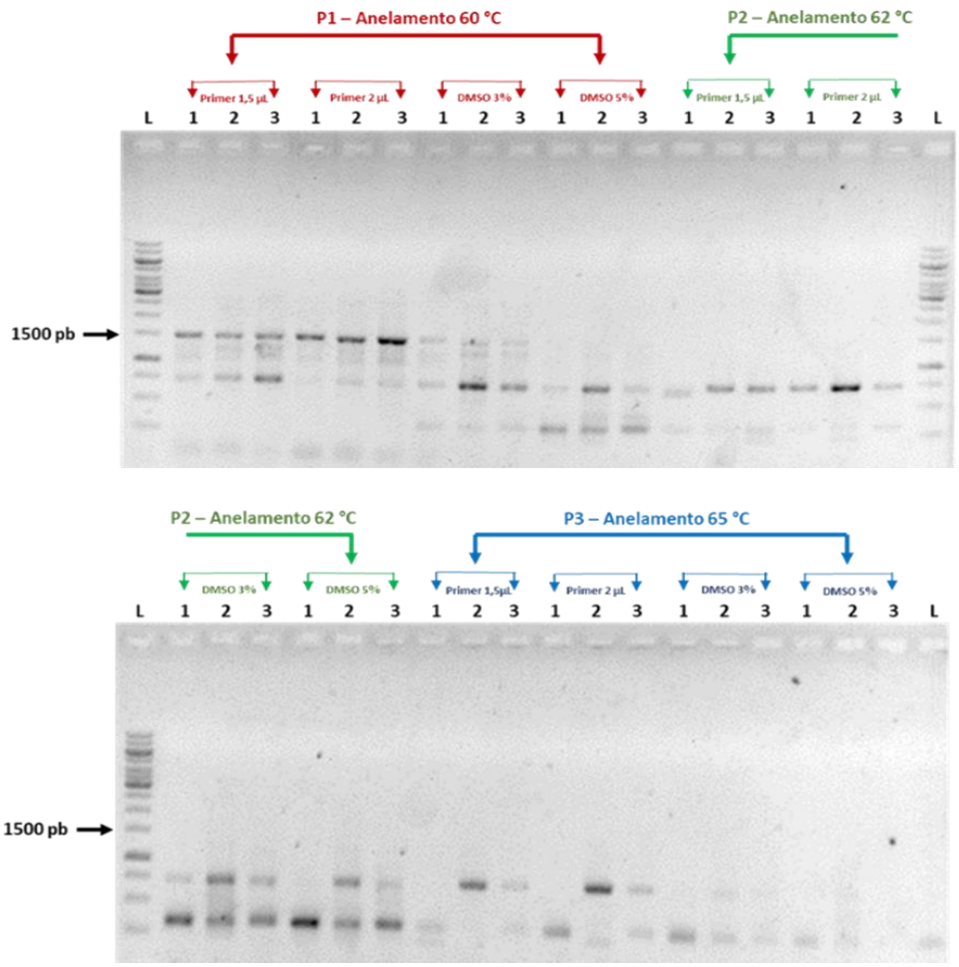
2,0 µL de cada Primer (Forward e Reverse)

1,5 µL de cada Primer (Forward e Reverse) + 3% de DMSO

1,5 µL de cada Primer (Forward e Reverse) + 5% de DMSO

O protocolo de PCR chamado P1 com uma temperatura de anelamento de 60°C foi o que teve melhores resultados na amplificação das amostras, mesmo ainda assim foi evidenciada a presença de bandas inespecíficas (Figura 23).

**Figura 13 -** PCR – Eletroforeses - Ensaio preliminar



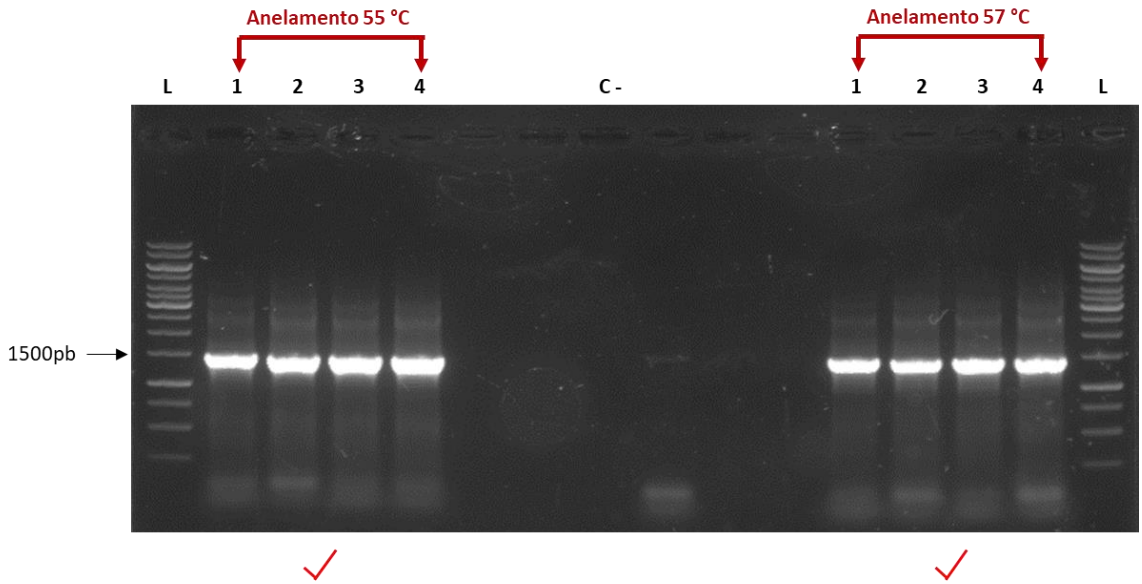

A padronização da PCR mostra como mudando as condições de anelamento pode ser observada uma diminuição das bandas inespecíficas com o protocolo de PCR P1.

Claramente as amplificações inespecíficas apareceram em todos os protocolos, mesmo colocando o DMSO em diferentes concentrações (tentando melhorar a adstringência do anelamento na reação). O aumento na quantidade de primers nas reações foi favorável para o

aparecimento das bandas de 1500 pb. Outro fato evidente foi que a expressão da banda de 1500 pb melhorou com a diminuição da temperatura do anelamento, um efeito não muito esperado, já que, ao diminuir a temperatura, também, diminui a adstringência, ou seja a capacidade de hibridação do ADN com sua sequência complementaria, neste caso os primers.

De acordo com os resultados obtidos, foi realizado uma reação de PCR, diminuindo a temperatura e o tempo do anelamento (55°C e 57°C por 1 minuto) (Figura 14). A diminuição da temperatura a 57°C com um tempo de anelamento de 1 minuto favoreceu a amplificação do gene rARN 16S (Figura 14). Desta forma, foram feitas as PCRs e as purificações dos fragmentos para iniciar com o sequenciamento.

**Figura 14 -** Padronização do protocolo de PCR.




O gel mostra a desaparição das bandas inespecíficas e uma boa intensidade da banda de 150 pb com uma temperatura de anelamento de 57°C

Uma vez obtidas as sequencias foram editadas com ChromasPro e analisadas mediante Eztaxon e BLAST, conseguindo a classificação e agrupamento das cepas em estudo. Tal como se mostra na Tabela 5 e 6.

**Tabela 2** - Bactérias identificadas com mais de 1300 pb.

| BRB | Ezbiocloud | | | BLAST | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Taxôn Ezbiocloud | Especie tipo | Homologia % | Descrição BLAST | Homologia |
| 284 | *Salinispora arenicola* | CNH-643(T) | 99.32 | *Salinispora arenicola* CNP193 | 99% |
| 298 | *Streptomyces phytohabitans* | KLBMP 4601(T) | 97.19 | *Streptomyces phytohabitans strain KLBMP 4601* | 97% |
| 302 | *Streptomyces phytohabitans* | KLBMP 4601(T) | 99.12 | *Streptomyces sp. HBERC-20821* | 99% |
| 320 | *Salinispora arenicola* | CNH-643(T) | 95.76 | *Salinispora sp. 13-33-23* | 94% |
| 349 | *Nocardiopsis prasina* | DSM 43845(T) | 98.06 | *Nocardiopsis sp. A01067* | 98% |
| 350 | *Streptomyces hydrogenans* | NBRC 13475(T) | 99.49 | *Streptomyces sp. strain NJSt4* | 99% |
| 355 | *Nocardiopsis prasina* | DSM 43845(T) | 98.16 | *Nocardiopsis sp. G057* | 98% |
| 356 | *Streptomyces hydrogenans* | NBRC 13475(T) | 99.19 | *Streptomyces violascens strain SBS11030* | 98% |
| 358 | *Streptomyces hydrogenans* | NBRC 13475(T) | 99.85 | *Streptomyces violascens strain SBS11030* | 99% |
| 364 | *Nocardiopsis quinghaiensis* | YIM 28A4(T) | 94.57 | *Nocardiopsis sp. G057* | 86% |
| 391 | *CP013984_s* | DE111 | 99.69 | *Bacillus subtilis strain EXWB4-09* | 99% |
| 397 | *Bacillus subtilis subsp. stercoris* | D7XPN1(T) | 98.99 | *Bacillus subtilis strain DE111* | 97% |
| 414 | *Salinispora arenicola* | CNH-643(T) | 99.78 | *Salinispora sp. 13-33-14* | 99% |
| 415 | *Salinispora arenicola* | CNH-643(T) | 99.85 | *Salinispora sp. 13-33-14* | 99% |
| 462 | *Salinispora arenicola* | CNH-643(T) | 99.56 | *Salinispora sp. 13-33-23* | 98% |
| 468 | *Salinispora arenicola* | CNH-643(T) | 99.85 | *Salinispora sp. 13-33-14* | 99% |
| 348 | *Pseudomonas songnenensis* | NEAU-ST5-5(T) | 98.62 | *Pseudomonas stutzeri DSM 10701* | **99%** |
| 352 | *Nocardiopsis prasina* | DSM 43845(T) | 98.25 | *Nocardiopsis sp. G057* | 98% |
| 408 | *CP013984_s* | DE111 | 99.37 | *Bacillus amyloliquefaciens strain Xmb038* | 99% |
| 417 | *Streptomyces coelicoflavus* | NBRC 15399(T) | 99.19 | *Streptomyces coelicoflavus KS-3* | 99% |
| 418 | *Streptomyces coelicoflavus* | NBRC 15399(T) | 99.49 | *Streptomyces glaucescens* | 98% |

**Tabela 3 -** Bactérias identificadas com menos de 1000 pb.

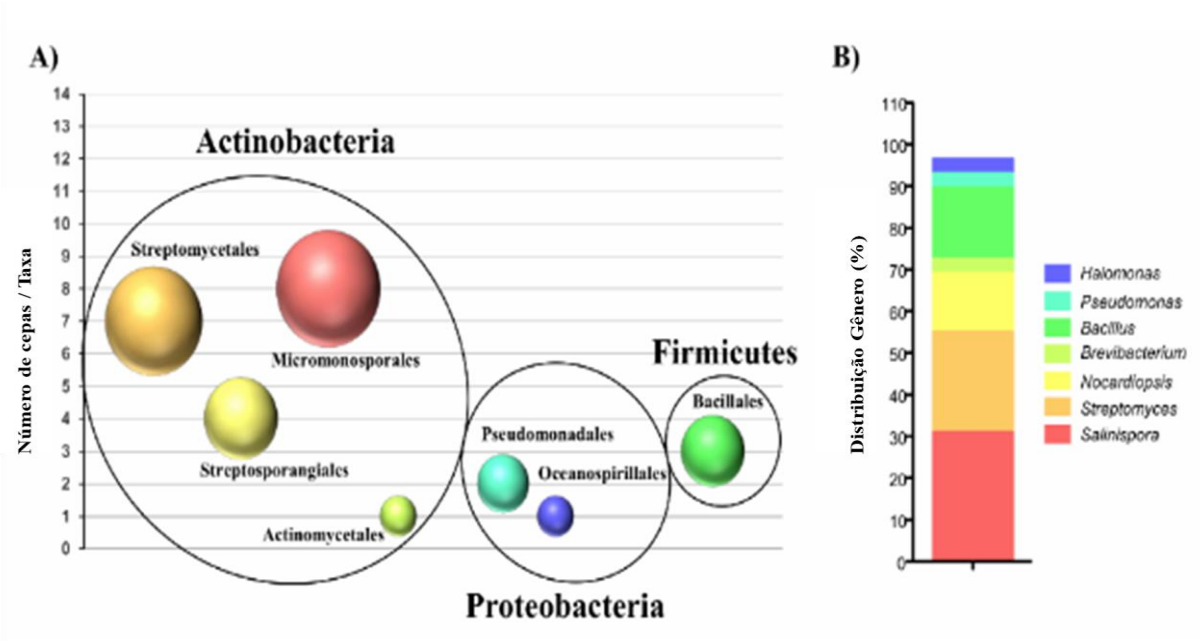
| BRB | Ezbiocloud | | | BLAST | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Taxôn Ezbiocloud | Especie tipo | Homologia % | Descrição BLAST | Homologia |
| 256 | *Salinispora arenicola* | CNH-643(T) | 96.54 | *Salinispora sp. 13-33-23* | 97% |
| 368 | *Brevibacterium celere* | KMM 3637(T) | 90.56 | *Brevibacterium oceani BBH7* | 96% |
| 399 | *Salinispora arenicola* | CNH-643(T) | 96.87 | *Salinispora sp. 13-33-14* | 94.5% |
| 413 | *Pseudomonas sihuiensis* | KCTC 32246(T) | 96.74 | *Pseudomonas sp. HG-15F partial* | 95% |
| 503 | *Halomonas lutescens* | Q1U(T) | 96.70 | *Halomonas venusta DSM 4743T* | 96.3 % |

O genoma das bactérias têm milhares de genes, porém, o gene rARN 16S é uma chave para a identificação baseada na filogenia, quando comparada com bases de dados de sequencias destes genes, bem selecionadas (52, 46) . Para identificar os gêneros das bactérias, foi usada uma base de dados amplamente usada na comunidade científica EzTaxon (http://www.ezbiocloud.net), que contem registros de genes rARN 16S das espécies tipo, incluindo a coleção de todas as sequencias de referência, parâmetro muito importante na procura da similaridade, cálculo da similaridade por pares, alinhamento de sequência múltipla e algoritmos de arvore filogenética, contendo mais de 9787 espécies (52). Existem bases de dados públicas inundados com sequências de cepas não tipo incluindo os clones ambientais que

podem conter erro e sequências mal etiquetadas. Por outro lado, o BLAST é baseado no alinhamento local que no pode-se usar para o cálculo da sequência geral semelhante (46).

Em primeiro lugar, as bactérias que produziram extratos citotóxicos foram selecionadas para serem identificadas por sequenciamento do gene 16S rARN. Portanto, descrevemos três filos: Actinobacteria, Proteobacteria e Firmicutes (Endobacteria) (Figura 15). O filo dominante foi Actinobacteria, que compreende quase o 77% das sequências classificadas de bactérias. Dentre as Actinobacterias, Micromonosporales e Streptomycetales foram as ordens taxonômicas mais abundantes (40,0% e 35,0%, respectivamente, em todas as bactérias classificadas), seguidas por Streptosporangiales (20,0%) e Actinomycetales (5,0%). Apenas 11,5% das bactérias foram Gram-negativas do filo Proteobacteria, incluindo Pseudomonadales (66,7%) e Oceanospirillales (33,3%). As restantes bactérias classificadas (11,5%) pertencem ao gênero *Bacillus* do filo Firmicutes.

**Figura 15 –** Agrupamento filogenético das bactérias




(A) Filogenia das bactérias identificadas. Das 26 bactérias identificadas foram agrupadas em 3 grandes filos taxonômicos: Actinobacterias, Proteobacterias e Firmicutes (Endobacterias), e sete classes taxonômicas diferentes. (B) Mostra a distribuição das bactérias por gênero.

O gênero *Streptomyces* e a *Salinispora* foram encontrados com alta abundância no Atol das Rochas. O gênero *Streptomyces* foi recuperado de todos os tipos de amostras usadas neste trabalho, por outro lado, curiosamente, de 8 amostras de *Salinispora*, 6 foram recuperadas de ascídias, enquanto as outras duas foram de esponjas, e nenhuma foi recuperada de amostras de sedimento. Particularmente, o gênero *Salinispora* foi recentemente descrito em ilhas brasileiras

por (Bauermeister et al., 2018, artigo submetido). Uma espécie desse gênero, *S. arenicola*, é conhecida como produtora de substâncias como saliniquetais e rifamicinas, compostos com alta citotoxicidade, o que pode justificar a citotoxicidade observada para seus respectivos extratos brutos.

Embora, a existência da alta homologia gênica presente em determinados gêneros bacterianos, ou uma recente mudança na sua assinatura taxonômica, não permite realizar uma identificação ao nível de espécie ou de gênero com o ARNr 16S. Neste caso outras análises fazem-se necessárias para a identificação da espécie. Os genes descritos com uma maior frequência e com utilidade na taxonomia bacteriana e/ou filogenia são: 16S-23S ARNr, ARNr 23S, rpoB (subunidade da ARN polimerase), e a gyrB (subunidade ß da ADN girasse).

Há diferentes critérios com relação à porcentagem de similaridade do ARNr 16S, para pertencer ou não a uma mesma espécie. As vezes o critério depende do gênero e/ou da espécie em estudo. Desta forma, genogrupos com características fenotípicas exclusivas e < 1% de diferença na sequência do rARN 16S, podem ser classificados como novas espécies.

Um critério proposto é aceitar que a similaridade ≥ 98,5% define espécie, e resultados ≥ 95 ao 98,5% definiria o gênero. Mesmo assim, e como já tem sido escrito antes, definir espécie ou gênero através de um valor para o rARN 16S, pode não ser apropriado para todos os géneros (53).

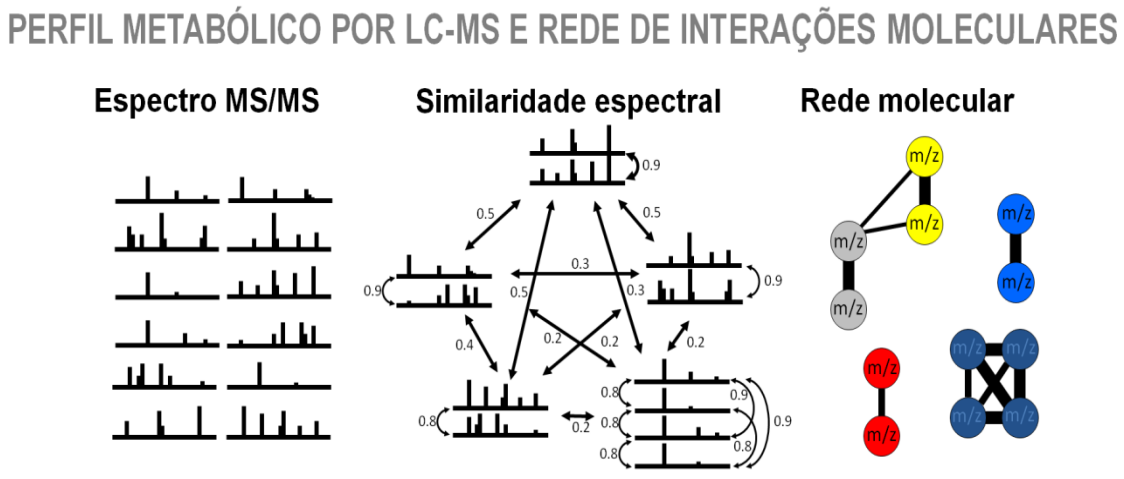
## 4.3 Diversidade química produzidas pelas bactérias – Network molecular

Essa grande diversidade microbiana encontrada no Atol das Rocas deve produzir uma enorme diversidade de estruturas distintas de moléculas químicas. No entanto, considerando o grande número de extratos obtidos neste trabalho, seria extremamente difícil desreplicá-los manualmente, ou seja, identificar as substâncias químicas presentes nos extratos brutos sem a necessidade de isolamento das mesmas. O processo de desreplicação de extratos brutos tem-se realizado principalmente por interpretação de dados de UV, MS, MS/MS e de RMN, e em alguns casos, é necessário isolar os componentes químicos, a fim de obter dados mais específicos, o que é trabalhoso e demorado (76, 77).

A espectrometria de massa, por sua vez, é uma ferramenta poderosa capaz de gerar valiosas informações estruturais por meio de reações em fase gasosa, acelerando a identificação dos compostos em mistura (76, 57). O acoplamento da cromatografia líquida a técnica de espectrometria de massa permitiu o estudo de misturas complexas, tais como extratos de fontes naturais e, além de gerar um grande número de dados em relação à sua composição química. Assim, para um grande número de amostras, o processo de interpretação manual torna-se

impraticável. Neste contexto, a Rede Molecular do GNPS (58) pode ser de grande ajuda. O método de rede de interações moleculares organiza e facilita a interpretação de grandes conjuntos de espectros de MS/MS baseado na similaridade de fragmentação de íons precursores (59), congregando classes de metabólitos que partilham de um "mesmo" perfil espectral, uma vez que moléculas de uma mesma classe química, geralmente, apresentam semelhante perfil de fragmentação. Brevemente, este método realiza o agrupamento de espectros pertencentes a um mesmo pico e/ou mesma substância (nível de similaridade >99%) para, em seguida, criar uma rede molecular a partir da similaridade dos espectros de MS/MS, determinada através da conversão dos espectros em vetores e calculados a partir do método de similaridade dos cossenos. A identificação de moléculas então é facilitada ao gerar agrupamentos que atuam como uma "semente" espectral, isto é, serve como ponto de partida para determinação de substâncias, por exemplo de uma série homologa. Após organizar os espectros de MS/MS por similaridade espectral, os dados são visualizados no software ***Cytoscape***® e disponíveis através de figuras compostas por nodos e linhas de conexão, conforme mostrado na Figura 16. (74, 76)

**Figura 16 -** Representação esquemática da rede de interações moleculares

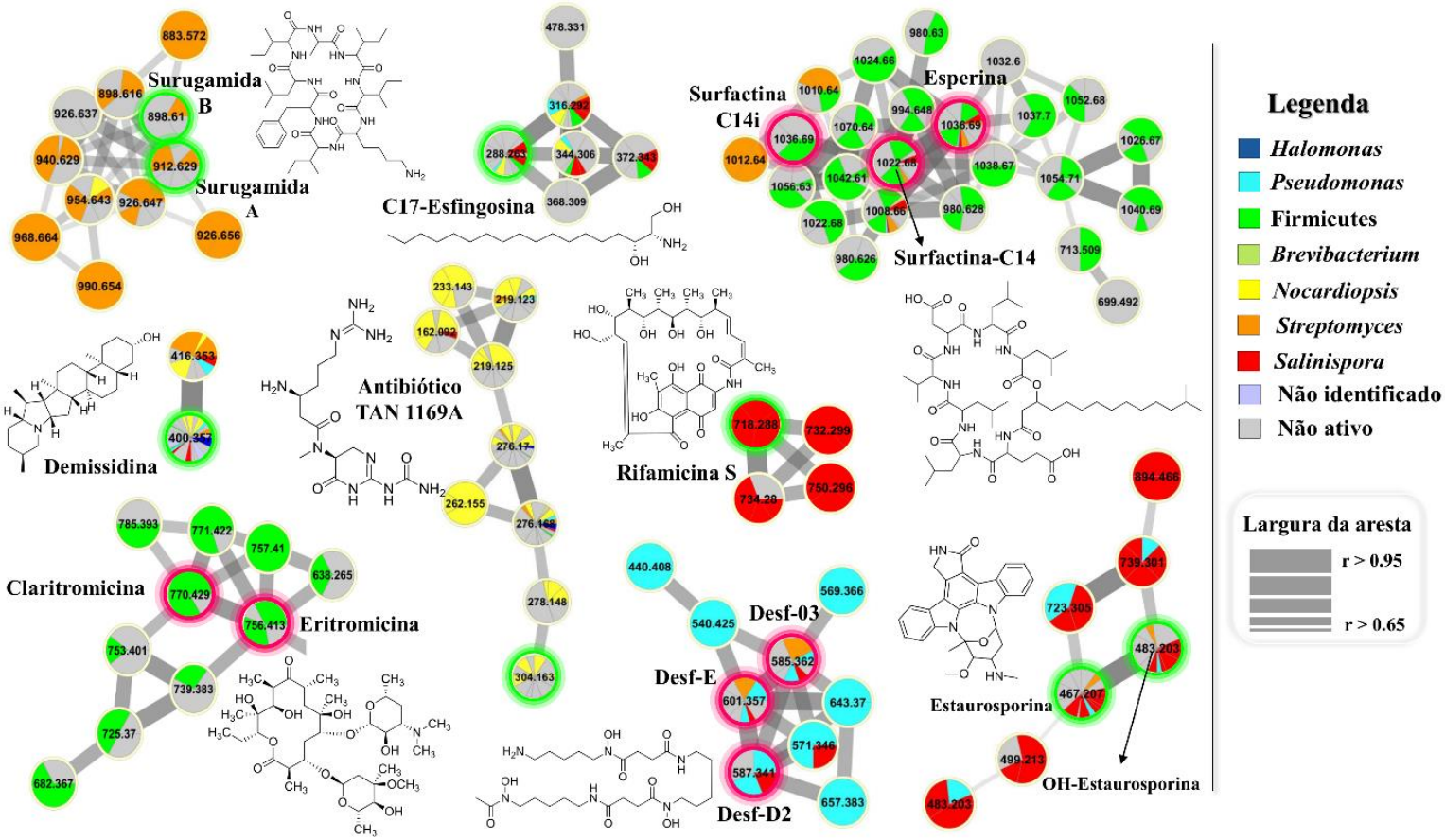



Para evitar a interpretação de contaminantes e ruído, injeções de fase móvel serão inseridas na análise de redes moleculares em um grupo distinto e identificadas no Cytoscape® como nodos de cor branca. O nível de similaridade entre os íons precursores (nodos) será determinado pela espessura da linha de ligação entre eles, onde mais espesso significa maior similaridade.

Dessa forma, os extratos brutos produzidos pelas bactérias recuperadas de Atol das Rocas, foram analisados por HPLC-MS/MS, a fim de construir uma rede molecular para comparação das amostras, e também para investigar a diversidade química por desreplicação de substâncias

conhecidas. Nesta etapa, todos os extratos brutos (citotóxicos e não citotóxicos) foram incluídos nas análises. Essa abordagem foi utilizada para identificar famílias moleculares que estão presentes apenas em extratos citotóxicos, com foco em metabólitos que podem ser responsáveis pela atividade biológica apresentada pelo extrato. Metabólitos que também estão presentes em extratos não citotóxicos podem ser não-citotóxicos, ou apresentam baixo nível de citotoxicidade, ou ainda, estes metabólitos podem estar presentes em baixa concentração no extrato bruto. A rede molecular completa é mostrada no **ANEXO 3**, (após a remoção do branco do solvente) na qual cada nó/esfera representa um íon precursor de um espectro de MS/MS. A cor está se referindo à identificação da bactéria de acordo com a legenda. Para visualizar melhor os dados, na Figura 17 estão destacando alguns grupos de famílias moleculares que possuem pelo menos um nó anotado (identificado) pela biblioteca GNPS. Todos os espectros anotados foram verificados manualmente com dados da literatura.

**Figura 17 -** Redes moleculares de extratos produzidos por bactérias recuperadas do Atol Rocas




Considerando os dados do modo de ionização positiva (ESI +) após a remoção dos dados do solvente (branco). Os nós representam os íons precursores e sua cor está de acordo com a legenda, onde os extratos não citotóxicos (<75%) estão em cinza; e os extratos que apresentaram mais de 75% de inibição do crescimento de células tumorais são divididos pelo grupo taxonômico, Actinobacteria (*Brevibacterium, Streptomyces, Salinispora e Nocardiopsis*), Proteobacteria (*Pseudomonas e Halomonas*) e Firmicutes; extratos da bactéria não identificados (azul celeste).

A rede molecular (*Molecular Network*) permitiu a identificação de muitas classes de compostos químicos diferentes, tais como: dicetopiperazinas, lipopeptídeos (incluindo surfactinas e esperina), surugamidas, estaurosporinas, esfingosinas, eritromicinas, antibiótico TAN, rifamicinas, demissidinas e o agente complexante de metais (sideróforos) desferrioxaminas. Estes resultados demonstram que as bactérias do Atol das Rocas são uma rica fonte de compostos com interesse biotecnológicos e farmacológicos.

Dicetopiperazinas (DKPs) (dados não mostrados) foram descritas como detentoras de diversas atividades biológicas, tais como: imunossupressão, antibacteriana, antifúngica, nematicida, inseticida e também citotoxicidade contra muitos tipos diferentes de linhagens celulares de câncer, incluindo células resistentes (61, 62). Além disso, as DKPs tem sido descritas como moléculas de baixo peso molecular, responsáveis pela sinalização e comunicação química entre plantas e bactérias patogénicas de plantas (81, 82), a produção de tais metabolitos pelas bactérias patogênicas, poderiam gerar uma grande gama de respostas funcionais em plantas.

Embora a atividade antimicrobiana não tenha sido avaliada neste trabalho, muitas das classes químicas identificadas, compreendem substâncias descritas na literatura como antimicrobianas. Por exemplo, os antibióticos como: rifamicina, rifampicina e rifapentina, são antimicobacterianos produzidos por actinobactérias, que têm sido especificamente usados no tratamento da tuberculose (47). Aqui, as rifamicinas foram produzidas apenas por cepas de *Salinispora*, e apenas um íon dessa família molecular foi detectado em um extrato não citotóxico. Por outro lado, lipopeptídeos, tal como surfactinas, são agentes surfactantes produzidas por membros do gênero *Bacillus* que apresentam uma ampla gama de aplicações antibióticas. No presente trabalho, lipopeptídeos foram detectados em extratos produzidos principalmente por membros do filo Bacilli, e em menor proporção, em extratos de estirpes de *Streptomyces*, *Nocardiopsis* e *Salinispora*. Estes lipopeptideos cíclicos têm capacidade de penetrar nas membranas celulares, o que lhes confere ação antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, e também contra fungos.

A eritromicina é um macrolídeo amplamente usado como agente antibiótico no tratamento de várias infecções bacterianas (65). Geralmente é produzido por actinobactérias, incluindo *Streptomyces* e *Saccharopolyspora*. Esta classe química foi detectada principalmente nas amostras não citotóxicas (BRB-407 e BRB-504), mas, curiosamente, pela primeira vez, nos membros do filo Firmicutes (BRB-397 e BRB-408). A classe potente do antibiótico TAN também foi detectada, sendo produzida principalmente por *Nocardiopsis* e alguns extratos não

citotóxicos. Os membros deste antibiótico dipeptídico apresentaram atividade contra bactérias Gram-positivas e também Gram-negativas, mas especialmente contra cepas resistentes (66).

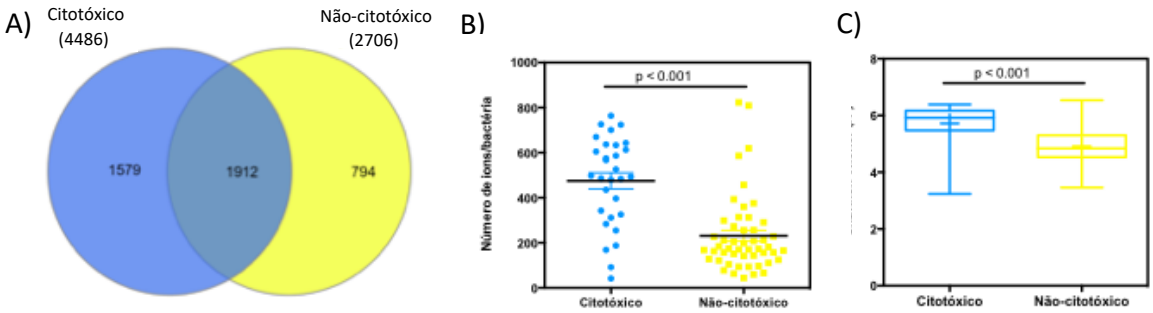
Ainda em relação aos peptídeos, devemos destacar a presença de surugamidas, octapeptídeos cíclicos que são produzidos por *Streptomyces* sp., e que foram recentemente descritos (67) e ainda são pouco estudados. Neste trabalho, um clusters contendo 11 membros de surugamidas foram detectados em extratos não citotóxicos e extratos produzidos por cepas de *Streptomyces*, mas também por cepas de *Nocardiopsis* (BRB-352). Estes compostos são inibidores da catepsina B, uma cisteína peptidase muito expressa em muitos processos patológicos, tais como inflamação e câncer. Sendo assim, inibidores da catepsina B são compostos promissores a serem aplicados em tratamentos contra o câncer (68). Por enquanto, existem apenas 5 surugamidas A-E foram descritas na literatura, o que destaca a presença de novos derivados desta família nas amostras aqui estudada. Esses fatos tornam as surugamidas produzidas por bactérias do Atol Rocas uma classe química muito interessante a ser profundamente investigada.

Em relação aos compostos descritos com atividade anticâncer, também foi identificado neste trabalho, estaurosporinas e saliniquetais. A estaurosporina e derivados putativos foram extensamente estudados durante anos nas suas propriedades anticâncer, por exemplo, um análogo de estaurosporina foi recentemente aprovado para o FDA para ser aplicado em tratamentos contra o câncer. A estaurosporina e os derivados foram anteriormente isolados pelo nosso grupo de pesquisa a partir de ascídia brasileira *Eudistoma vannamei* coletada na costa oeste cearense e em uma cepa de *Streptomyces* sp. associada a esta ascídia (69). Neste trabalho, esta família foi produzida principalmente por cepas de *Salinispora*, mas também por *Streptomyces* e *Pseudomonas*. Por outro lado, saliniquetais A e B, dois policetideos incomuns bicíclicos, produzido pela *Salinispora arenicola* (actinomiceto obrigatoriamente marinho), induziu a inibição de ornitina descarboxilase, um alvo para a quimio-prevenção do câncer (70). Saliniquetais A e B foram detectados na maioria dos extratos produzidos por cepas de *Salinispora*. Esta classe química não está presente na rede molecular, mas foram detectadas e anotada pela biblioteca do GNPS, no entanto, eles não formam um grupo, o que pode ser justificado pela presença destes compostos em baixas concentrações na extratos, que levam à aquisição de espectros de baixa qualidade.

## 4.4 Rede Molecular *versus* citotoxicidade

Os dados utilizados para a construção da rede molecular foram exportados como uma tabela .cvs contendo a informação da distribuição dos ions precursores nas amostras. Foi detectado um total de 4285 metabólitos putativos, sendo 1912 comuns aos extratos ativos e não ativos, e 1579 únicos aos ativos (Figura 18A). Em geral, há mais íons nas amostras citotóxicas do que nas não-citotóxicas, enquanto as cepas citotóxicas produziram uma média de 475 ± 36 ions /estirpe, as não citotóxicas produziram 231 ± 24 metabólitos putativos/estirpe, representando uma taxa de aproximadamente 2:1 (Figura 18B). O índice de Shannon-Wiener (H ') (Figura 18C) mostra que os extratos citotóxicos apresentam um conteúdo metabólico mais diversos do que os extratos não citotóxicos.

**Figura 18 -** Caraterização dos extratos




(A) Diagram de Venn e (B) distribuição das amostras de acordo com o número de íons detectados nas amostras citotóxicas e não-citotóxicas; (C) Índice de Shannon-Wiener. Para construção destes gráficos foi considerado a tabela (csv) obtida da rede molecular do GNPS.

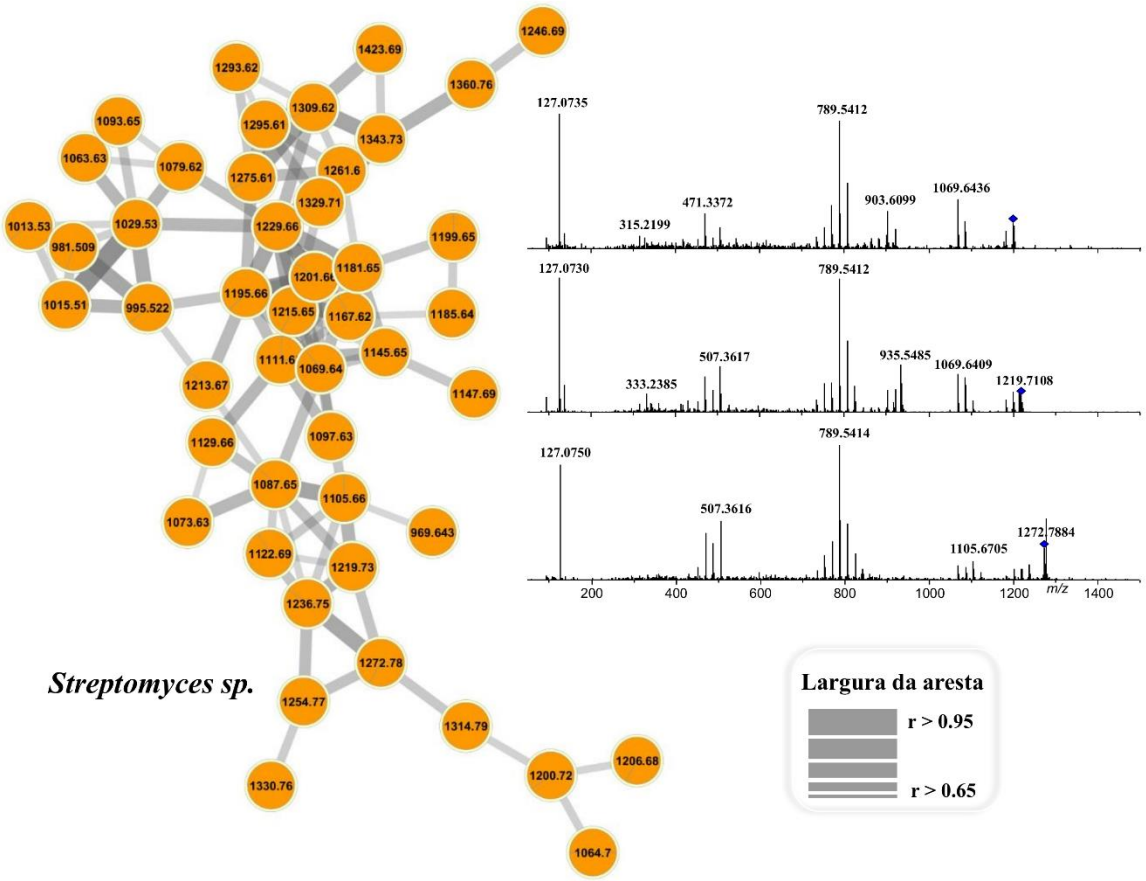
## 4.5 Famílias moleculares citotóxicas

A rede molecular também foi analisada com o intuito de destacar aglomerados de íons com maior probabilidade de serem responsáveis pela atividade biológica. Grupos de íons que estão presentes em amostras citotóxicas e não citotóxicas dificilmente serão os metabólitos bioativos. Tal estratégia permitiu concentrar-se apenas em alguns poucos grupos, diminuindo o número de possibilidades e identificando os grupos de moléculas mais interessantes a serem investigados. Entre as famílias moleculares identificadas estão as, rifamicina, lipopeptídeos e estaurosporina. Além disso, um grande aglomerado que chamou a atenção, e está representado em laranja na Figura 19, presente nas cepas BRB-298 e BRB-302, classificadas com *Streptomyces* sp. Tais aglomerados compreendem massa precursora no intervalo de 800 a 1400 m/z, aproximadamente. Os dados de MS e MS / MS mostraram que estes ions são compostos

glicosilados, e foi observada uma fragmentação na fonte que levou à geração de muitas massas originais para um mesmo composto.

Os espectros de MS / MS dos compostos de ambos clusters, não têm nenhuma correspondência com a biblioteca do GNPS, além disso, não se encontram em outras bibliotecas públicas pesquisadas, como o “Dicionário de Produtos Naturais” e “SciFinder”, indicando uma grande probabilidade de serem novos compostos. A abordagem aqui empregada permitiu o destaque de famílias moleculares com alta probabilidade de serem as responsáveis pela citotoxicidade dos extratos brutos, o que merece ser investigado no futuro.

**Figura 19 -** Grupo de uma família molecular citotóxica produzida por cepas de *Streptomyces* (BRB-298 e BRB-302)




A cor dos nós representa o gênero da actinobacteria, e a largura da aresta é de acordo com a similaridade espectral entre os nós.

No intuito de conhecer melhor essas substâncias, foi feito crescimento da bactéria BRB 302 em escala maior, obtendo como massa final 55 mg. Esse extrato foi fracionado em HPLC

obtendo-se 40 frações mais a limpeza da coluna. As frações resultantes foram analisadas por LC-MS e ensaios de citotoxicidade (Figura 20).

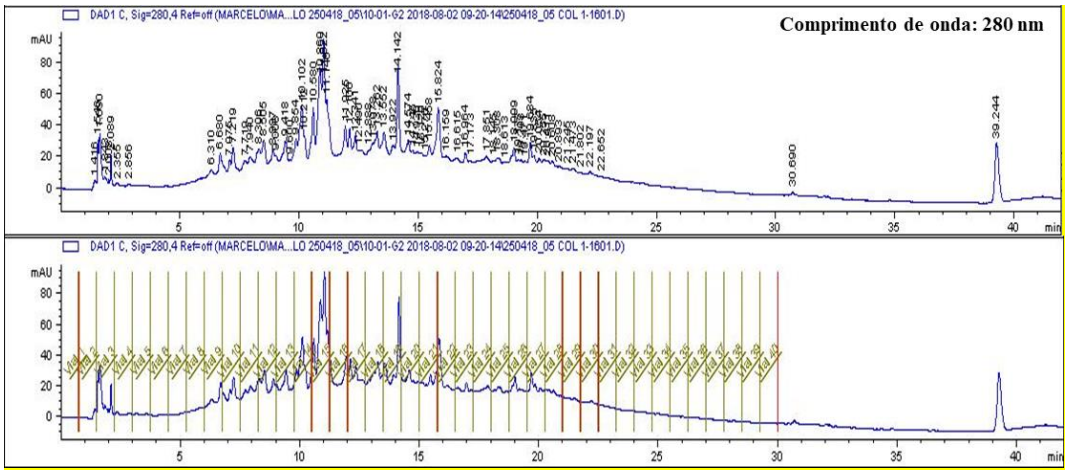
**Tabela 4 -** Fracionamento do cromatograma. Método e coluna.

| Tempo (min) | %A ($H_2O$ + 0,1% AF) | %B (MeOH) |
|---|---|---|
| 0 | 95 | 5 |
| 30 | 0 | 100 |
| 35 | 0 | 100 |
| 37 | 95 | 5 |
| 42 | 95 | 5 |

C = 50 mg/mL; Vinjeção = 20 µL; F = 1,0 mL/min

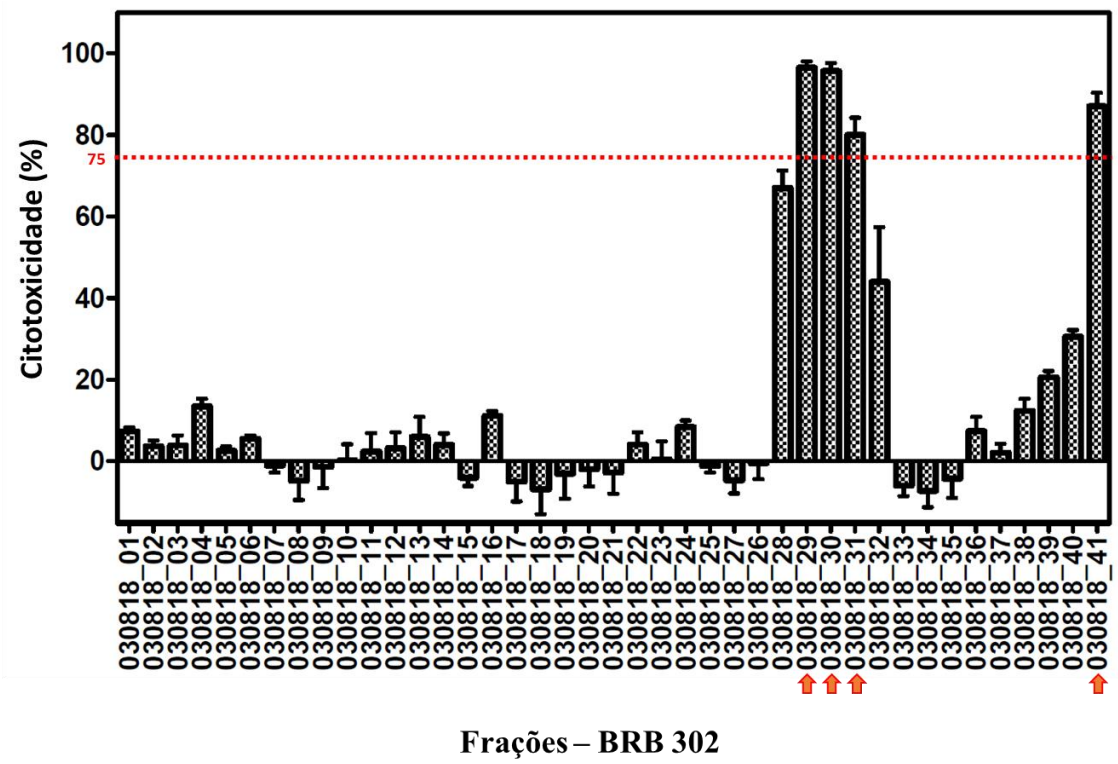
Coluna: Luna C18, 4,6 x 150 mm, 3,5 µm, 45ºC

**Figura 20** - LC-MS das frações resultantes da BRB 302




As 40 frações resultantes, foram testadas em HCT-116 com o ensaio de MTT, mostrando os seguintes resultados, Figura 21.

**Figura 21 -** Citotoxicidade das frações da BRB 302




Das 40 frações testadas, 4 são citotóxicas (≥75%), com valores maiores a 80% de citotoxicidade, lembrando que o extrato da BRB 302, é considerado muito promissor, visto que, apresenta citotoxicidades maiores ao 100% nas duas concentrações testadas (5 e 50 μg/mL). A análise preliminar dessas frações por LC-MS mostra a presença dos ions relacionados ao cluster apresentado na Figura 19, sugerindo que essas substâncias possam ser responsáveis pela atividade observada no extrato.

# 5 CONCLUSÕES

De forma geral, o Atol das Rocas abriga uma diversidade única com microbiota associada produtora de substâncias com importância farmacológica. A abordagem empregada foi muito eficiente e satisfatória, o que permitiu a detecção e identificação de diversas classes químicas produzidas pelas amostras bacterianas avaliadas. Particularmente, isso foi possível devido à espectrometria de massa ser uma ferramenta muito versátil que gera um grande número de dados, incluindo informações estruturais importantes de moléculas orgânicas, que aceleraram a identificação de compostos nos extratos brutos. Além disso, o uso da plataforma GNPS, que é uma grande novidade para a Pesquisa de Produtos Naturais, acelerou a desreplicação de compostos conhecidos sem isolamento e, além disso, destacou grupos químicos de compostos que são os responsáveis da atividade biológica. Além disso, foi identificado o gênero da maioria das bactérias, isolando e identificando o gene rARN 16S das bactérias com atividade citotóxica, permitindo relacionar os grupos químicos identificados com os gêneros bacterianos identificados. Portanto, podemos concluir que o Brasil possui uma fonte inestimável de biodiversidade nos ecossistemas das suas ilhas, que deve ser altamente protegida contra qualquer tipo de ação antrópica para evitar alterações ou perdas das espécies atuais.

# REFERÊNCIAS

1. Malve H. Exploring the ocean for new drug developments: Marine pharmacology. J Pharm Bioallied Sci [Internet]. 8(2):83–91.
2. Soldatou S, Baker BJ. Cold-water marine natural products, 2006 to 2016. Nat Prod Rep. 2017;34(6):585–626.
3. Blunt JW, Carroll AR, Copp BR, Davis RA, Keyzers RA, Prinsep MR. Marine natural products. Nat Prod Rep. 2018;35(1):8–53.
4. Donia M, Hamann MT. Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. Lancet. 2003;3(June):338–48.
5. Kijjoa A, Sawangwong P. Drugs and Cosmetics from the Sea. Mar Drugs [Internet]. 2004 May 25;2(2):73–82.
6. Murti Y, Agrawal T. Marine derived pharmaceuticals-development of natural health products from marine biodiversity. Int J ChemTech Res. 2010;2(4):2198–217.
7. M. Begon; C. Townsend; J Harper. Ecology: From Individuals to Ecosystems. 4th Editio. Wiley-Blackwell, editor. 2005. 750 p.
8. Turon M, Cáliz J, Garate L, Casamayor EO, Uriz MJ. Showcasing the role of seawater in bacteria recruitment and microbiome stability in sponges. Sci Rep. 2018;8(1):15201.
9. Pita L, Rix L, Slaby BM, Franke A, Hentschel U. The sponge holobiont in a changing ocean: from microbes to ecosystems. Microbiome. 2018;6(1):46.
10. Anand TP, Bhat AW, Shouche YS, Roy U, Siddharth J, Sarma SP. Antimicrobial activity of marine bacteria associated with sponges from the waters off the coast of South East India. Microbiol Res. 2006 Jul;161(3):252–62.
11. Liu YF, Yu SS. Survey of natural products reported by Asian research groups in 2016. J Asian Nat Prod Res. 2017;19(11):1047–72.
12. Cragg GM, Grothaus PG, Newman DJ. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. Chem Rev. 2009;109(7):3012–43.
13. Swierts T, Dfr C, Nj DV. Prokaryotic communities of Indo-Pacific giant barrel sponges are more strongly influenced by geography than host phylogeny.
14. Palanisamy SK, Rajendran NM, Marino A. Natural Products Diversity of Marine Ascidians (Tunicates; Ascidiacea) and Successful Drugs in Clinical Development. Nat Products Bioprospect. 2017;7(1):1–111.
15. Sipkema D, de Caralt S, Morillo JA, Al-Soud WA b., Sørensen SJ, Smidt H, et al. Similar sponge-associated bacteria can be acquired via both vertical and horizontal transmission. Environ Microbiol. 2015;17(10):3807–21.
16. Schmidt EW, Donia MS. Life in cellulose houses: symbiotic bacterial biosynthesis of

ascidian drugs and drug leads. Curr Opin Biotechnol. 2010 Dec;21(6):827–33.

17. Molloy EM, Hertweck C. Antimicrobial discovery inspired by ecological interactions. Curr Opin Microbiol. 2017 Oct;39:121–7.
18. Shenkar N, Swalla BJ. Global diversity of Ascidiacea. PLoS One. 2011;6(6).
19. Gerwick WH, Moore BS. Lessons from the Past and Charting the Future of Marine Natural Products Drug Discovery and Chemical Biology. Chem Biol. 2012 Jan;19(1):85–98.
20. Prieto-Davó A, Dias T, Gomes SE, Rodrigues S, Parera-Valadez Y, Borralho PM, et al. The Madeira Archipelago As a Significant Source of Marine-Derived Actinomycete Diversity with Anticancer and Antimicrobial Potential. Front Microbiol. 2016 Oct 7;7(OCT):1–12.
21. Jose PA, Jha B. Intertidal marine sediment harbours Actinobacteria with promising bioactive and biosynthetic potential. Sci Rep. 2017;7(1):10041.
22. Organization WH. On noncommunicable diseases. global Status Report. 2014 [cited 2016 Jun 1]. p. 302.
23. Stats KEY. Worldwide. 2015;
24. Folgenden I, Menge D, Folgenden I. a ; 2.. Vol. 157. 2014. 1-2 p. Available from: http://www.inca.gov.br/bvscontrolecancer/publicacoes/edicao/Estimativa_2016.pdf
25. Vogelzang NJ, Benowitz SI, Adams S, Aghajanian C, Chang SM, Dreyer ZAE, et al. Clinical cancer advances 2011: Annual report on progress against cancer from the American Society of Clinical Oncology. J Clin Oncol. 2012;30(1):88–109.
26. Costa-Lotufo L V., Montenegro RC, Alves APNN, Madeira SVF, Pessoa C, Moraes MEA de, et al. The Contribution of Natural Products as Source of New Anticancer Drugs: Studies Carried Out at the National Experimental Oncology Laboratory from the Federal University of Ceará. Rev Virtual Química. 2010;2(1):47–58.
27. Cuevas C, Francesch A. Development of Yondelis® (trabectedin, ET-743). A semisynthetic process solves the supply problem. Nat Prod Rep. 2009;26(3):322.
28. Zewail-Foote M, Hurley LH. Molecular approaches to achieving control of gene expression by drug intervention at the transcriptional level. Anticancer Drug Des. 1999 Feb;14(1):1–9.
29. Cortes J, Schöffski P, Littlefield BA. Multiple modes of action of eribulin mesylate: Emerging data and clinical implications. Cancer Treat Rev. 2018;70(August):190–8.
30. Geldof AA, Mastbergen SC, Henrar RE, Faircloth GT. Cytotoxicity and neurocytotoxicity of new marine anticancer agents evaluated using in vitro assays.

Cancer Chemother Pharmacol. 1999;44(4):312–8.

31. Vera MD, Joullie MM. Natural products as probes of cell biology: 20 Years of didemnin research. Med Res Rev. 2002;22(2):102–45.
32. Plummer R, Lorigan P, Brown E, Zaucha R, Moiseyenko V, Demidov L, et al. Phase I–II study of plitidepsin and dacarbazine as first-line therapy for advanced melanoma. Br J Cancer. 2013 Sep 29;109(6):1451–9.
33. Lillebø AI, Teixeira H, Morgado M, Martínez-López J, Marhubi A, Delacamara G, et al. Ecosystem-based management planning across aquatic realms at the Ria de Aveiro Natura 2000 territory. Sci Total Environ. 2018;650:1898–912.
34. de Oliveira Filho EC, Ugadim Y. A survey of the marine algae of Atol das Rocas (Brazil). Phycologia. 1976 Mar;15(1):41–4.
35. Fonseca AC, Villaça R, Knoppers B. Reef Flat Community Structure of Atol das Rocas, Northeast Brazil and Southwest Atlantic. J Mar Biol. 2012;2012:1–10.
36. Gherardi DFM, Bosence DWJ. Modeling of the Ecological Succession of Encrusting Organisms in Recent Coralline-Algal Frameworks from Atol Das Rocas, Brazil. Palaios. 1999;14(2):145.
37. Paiva S V., Oliveira Filho RR de, Lotufo TM da C. Ascidians from Rocas Atoll, northeast Brazil. Front Mar Sci. 2015;2(June):1–20.
38. Kikuchi RK. Atol das Rocas, litoral do nordeste do Brasil. In: Schobbenhaus et, editor. Sítios geológicos e paleontológicos do Brasil. 1st ed. Departamento Nacional da Produção Mineral; 2002. p. 379–90.
39. J. W. Nybakken and M. D. Bertness. Marine Biology: An Ecological Approach. 6th editio. Pearson/Benjamin Cummings, editor. San Francisco, Calif, USA; 2004.
40. Connell JH, Hughes TP, Wallace CC. A 30-year study of coral abundance, recruitment, and disturbance at several scales in space and time. Ecol Monogr. 1997;67(4):461–88.
41. Azevedo F, Padua A, Moraes F, Rossi A, Muricy G, Klautau M. Taxonomy and phylogeny of calcareous sponges (Porifera: Calcarea: Calcinea) from Brazilian mid-shelf and oceanic islands. Zootaxa. 2017;4311(3):301–44.
42. Bouth HF, Leite TS, Lima FD de, Oliveira JEL. Atol das Rocas: an oasis for Octopus insularis juveniles (Cephalopoda: Octopodidae). Zool. 2011;28(1):45–52.
43. Mosmann T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival : Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. 1983;65:55–63.
44. Promega. Wizard Genomic DNA Purification Kit Quick Protocol, FB022. 2010;1123–6.

45. Gontang EA, Fenical W, Jensen PR. Phylogenetic diversity of gram-positive bacteria cultured from marine sediments. Appl Environ Microbiol. 2007;73(10):3272–82.
46. Kumar V, Bharti A, Gusain O, Bisht GS. An Improved Method for Isolation of Genomic DNA from Filamentous Actinomycetes. J Eng Technol Manag. 2010;2(July):10–3.
47. Alfarisi O, Alghamdi WA, Al-Shaer MH, Dooley KE, Peloquin CA. Rifampin vs. rifapentine: what is the preferred rifamycin for tuberculosis? Expert Rev Clin Pharmacol. 2017;10(10):1027–36.
48. Shannon P, Markiel A, Owen Ozier 2, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. Genome Res. 2003;(13):2498–504.
49. Peter S, Paul S, Ferreira EG, Torres CM, Alison B, Larissa LF. Prospecting anticancer compounds in actinomycetes recovered from the sediments of Saint Peter and Saint Paul's Archipelago, Brazil. 2016;
50. Jimenez PC, Fortier SC, Lotufo TM., Pessoa C, Moraes MEA, de Moraes MO, et al. Biological activity in extracts of ascidians (Tunicata, Ascidiacea) from the northeastern Brazilian coast. J Exp Mar Bio Ecol. 2003 Feb;287(1):93–101.
51. Vidgen ME, Hooper JNA, Fuerst JA. Diversity and distribution of the bioactive actinobacterial genus Salinispora from sponges along the Great Barrier Reef. Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol. 2012;101(3):603–18.
52. Kim OS, Cho YJ, Lee K, Yoon SH, Kim M, Na H, et al. Introducing EzTaxon-e: A prokaryotic 16s rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. Int J Syst Evol Microbiol. 2012;62(PART 3):716–21.
53. Bou G, Fernández-Olmos A, García C, Sáez-Nieto JA, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011;29(8):601–8.
54. Gaudêncio SP, Pereira F. Dereplication: Racing to speed up the natural products discovery process. Nat Prod Rep. 2015;32(6):779–810.
55. Brunetti AE, Carnevale Neto F, Vera MC, Taboada C, Pavarini DP, Bauermeister A, et al. An integrative omics perspective for the analysis of chemical signals in ecological interactions. Chem Soc Rev. 2018;47(5):1574–91.
56. Bauermeister A, Aguiar FA, Marques LMM, Malta JDS, Barros F, Callejon DR, et al. In vitro metabolism evaluation of the ergot alkaloid dihydroergotamine: Application of microsomal and biomimetic oxidative model. Planta Med. 2016;82(15):1368–73.
57. Demarque DP, Crotti AEM, Vessecchi R, Lopes JLC, Lopes NP. Fragmentation

reactions using electrospray ionization mass spectrometry: An important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. Nat Prod Rep. 2016;33(3):432–55.

58. Biotechnol N. Sharing and community curation of mass spectrometry data with GNPS HHS Public Access. Nat Biotechnol. 2016;34(8):828–37.
59. Watrous J, Roach P, Alexandrov T, Heath BS, Yang JY, Kersten RD, et al. Mass spectral molecular networking of living microbial colonies. Proc Natl Acad Sci. 2012;109(26):E1743–52.
60. Mohimani H, Gurevich A, Mikheenko A, Garg N, Nothias LF, Ninomiya A, et al. Dereplication of peptidic natural products through database search of mass spectra. Nat Chem Biol. 2017;13(1):30–7.
61. Ma YM, Liang XA, Kong Y, Jia B. Structural Diversity and Biological Activities of Indole Diketopiperazine Alkaloids from Fungi. J Agric Food Chem. 2016;64(35):6659–71.
62. Rabindran SK, He H, Singh M, Brown E, Collins KI, Annable T, et al. Reversal of a novel multidrug resistance mechanism in human colon carcinoma cells by fumitremorgin C. Cancer Res. 1998;58(24):5850–8.
63. Venturi V, Fuqua C. Chemical Signaling Between Plants and Plant-Pathogenic Bacteria. Annu Rev Phytopathol. 2013;51(1):17–37.
64. Da Silva MM, Andrade MDS, Bauermeister A, Merfa MV, Forim MR, Fernandes JB, et al. A simple defined medium for the production of true diketopiperazines in Xylella fastidiosa and their identification by Ultra-fast liquid chromatography-electrospray ionization ion trap mass spectrometry. Molecules. 2017;22(6):1–15.
65. Vázquez-Laslop N, Mankin AS. How Macrolide Antibiotics Work. Trends Biochem Sci. 2018;43(9):668–84.
66. KATAYAMA N, FUKUSUMI S, FUNABASHI Y, IWAHI T, ONO H. TAN-1057 A-D, new antibiotics with potent antibacterial activity against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Taxonomy, fermentation and biological activity. J Antibiot (Tokyo). 1993;46(4):606–13.
67. Takada K, Ninomiya A, Naruse M, Sun Y, Miyazaki M, Nogi Y, et al. Surugamides A − E, Cyclic Octapeptides with Four. 2013;50:3–7.
68. Gobec S, Frlan R. Inhibitors of Cathepsin B. Curr Med Chem. 2006;13(19):2309–27.
69. Andréo MA, Jimenez PC, Siebra JBCN, Costa-Lotufo L V., Vessecchi R, Niehues M, et al. Systematic UPLC-ESI-MS/MS study on the occurrence of staurosporine and

derivatives in associated marine microorganisms from eudistoma vannamei. J Braz Chem Soc. 2012;23(2):335–43.

70. Williams PG, Asolkar RN, Kondratyuk T, Pezzuto JM, Jensen PR, Fenical W. Saliniketals A and B, bicyclic polyketides from the marine actinomycete Salinispora arenicola. J Nat Prod. 2007;70(1):83–8.

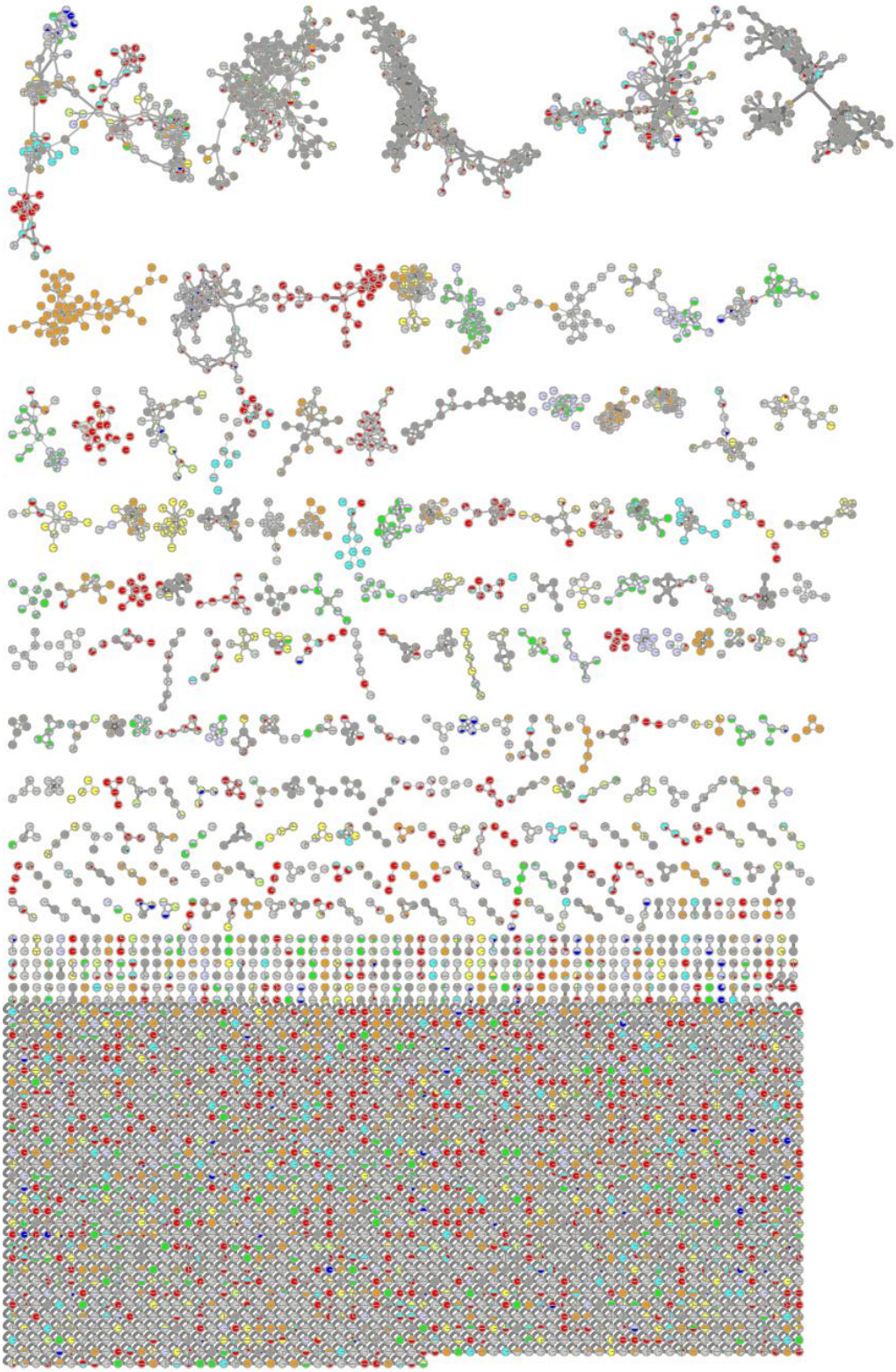
# ANEXOS

**ANEXO 1.** Dados gerais - pontos de coleta.

| BRB | Local | Origem | Latitude (S) | Longitude (W) | Profundidade (m) | Data | Meio |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **256** | Farol II | *Euherdmania* sp. | 3° 51´ 23.1´´ | 33° 51´ 23.1´´ | N/A | Maio 2015 | SWA |
| **283** | Farol II | *Didemnum granulatum* | 3° 51´ 23.1´´ | 33° 51´ 23.1´´ | N/A | Maio 2015 | SWA |
| **284** | Farol II | *Euherdmania* sp. | 3° 51´ 23.1´´ | 33° 51´ 23.1´´ | N/A | Maio 2015 | SWA |
| **285** | Âncoras | Sp.nova 3 | 3° 52´ 10.1´´ | 33° 48´ 10.6´´ | N/A | Maio 2015 | TM |
| **288** | Cemitério Rocky shore | *Trididemnum rocasensis* | 3° 51´ 96.3´´ | 33° 48´ 43.1´´ | N/A | Maio 2015 | A1 |
| **297** | Cemitério Rocky shore | *Trididemnum rocasensis* | 3° 51´ 96.3´´ | 33° 48´ 43.1´´ | N/A | Maio 2015 | A1 |
| **298** | Âncoras | Sp.nova 3 | 3° 52´ 10.1´´ | 33° 48´ 10.6´´ | N/A | Maio 2015 | SWA |
| **301** | Falsa barreta | *Polysyncraton maurizeliae* | 3° 51´ 37.1´´ | 33° 49´ 07.4´´ | N/A | Maio 2015 | A1 |
| **302** | Falsa barreta | Sp.nova 1 | 3° 51´ 37.1´´ | 33° 49´ 07.4´´ | N/A | Maio 2015 | SWA |
| **304** | Âncoras | Sp.nova 3 | 3° 52´ 10.1´´ | 33° 48´ 10.6´´ | N/A | Maio 2015 | SWA |
| **306** | Falsa barreta | *Polysyncraton maurizeliae* | 3° 51´ 37.1´´ | 33° 49´ 07.4´´ | N/A | Maio 2015 | A1 |
| **307** | Farol II | *Euherdmania* sp. | 3° 51´ 23.1´´ | 33° 51´ 23.1´´ | N/A | Maio 2015 | TM |
| **308** | Cemitério | *Ascidia viridina* | 3° 52´ 09.6´´ | 33° 49´ 00.4´´ | N/A | Maio 2015 | SWA |
| **309** | Farol II | *Didemnum granulatum* | 3° 51´ 23.1´´ | 33° 51´ 23.1´´ | N/A | Maio 2015 | TM |
| **311** | Farol II | *Euherdmania* sp. | 3° 51´ 23.1´´ | 33° 51´ 23.1´´ | N/A | Maio 2015 | SWA |
| **314** | Barretinha | Sp.nova 2 | 3° 51´ 36.0´´ | 33° 49´ 06.0´´ | N/A | Maio 2015 | A1 |
| **320** | Piscina dos nove | *Euherdmania* sp. | 3° 51´ 17.4´´ | 33° 48´ 44.0´´ | N/A | Maio 2015 | TM |
| **324** | Cemitério | *Ascidia viridina* | 3° 52´ 09.6´´ | 33° 49´ 00.4´´ | N/A | Maio 2015 | SWA |
| **326** | Âncoras | Sp.nova 3 | 3° 52´ 10.1´´ | 33° 48´ 10.6´´ | N/A | Maio 2015 | SWA |
| **346** | Salão | Sedimento 6 | Pendente | Pendente | 8 | 23/05/2016 | TM |
| **348** | Salão | Sedimento 6 | Pendente | Pendente | 8 | 23/05/2016 | TM |
| **349** | Rocas | *Chondrilla* cf. *nucula* | Pendente | Pendente | 0,5 | 25/05/2016 | A1 |
| **351** | Barretão | Sedimento 5 | Pendente | Pendente | 5 | 12/05/2016 | A1 |
| **352** | Barretão | Sedimento 5 | Pendente | Pendente | 5 | 12/05/2016 | A1 |
| **350** | Salão | *Plakinastrella microspiculifera* | Pendente | Pendente | 6 | 23/05/2016 | A1 |
| **353** | Salão | *Plakinastrella microspiculifera* | Pendente | Pendente | 6 | 23/05/2016 | TM |
| **354** | Barretão | Sedimento 5 | Pendente | Pendente | 5 | 12/05/2016 | A1 |
| **355** | Rocas | *Chondrilla* cf. *nucula* | Pendente | Pendente | 0,5 | 25/05/2016 | TM |
| **356** | Salão | *Plakinastrella microspiculifera* | Pendente | Pendente | 6 | 23/05/2016 | TM |
| **357** | Cemitério | *Chondrilla* cf. *nucula* | 3° 52´ 09.6´´ | 33° 49´ 00.4´´ | 0,2 | 17/05/2016 | TM |
| **358** | Salão | *Plakinastrella microspiculifera* | Pendente | Pendente | 6 | 23/05/2016 | TM |
| **359** | Âncoras | Sedimento 3 | 3° 52´ 10.1´´ | 33° 48´ 10.6´´ | 1,3 | 9/05/2016 | TM |
| **360** | Salão | Sedimento 6 | Pendente | Pendente | 8 | 23/05/2016 | TM |
| **361** | Rocas | *Chondrilla* cf. *nucula* | Pendente | Pendente | 0,5 | 25/05/2016 | A1 |
| **362** | Cemitério | *Chondrilla* cf. *nucula* | 3° 52´ 09.6´´ | 33° 49´ 00.4´´ | 0,2 | 17/05/2016 | A1 |
| **363** | Tartarugas | *Chondrilla* cf. *nucula* | Pendente | Pendente | 1 | 19/05/2016 | SWA |
| **364** | Rocas | *Chondrilla* cf. *nucula* | Pendente | Pendente | 0,5 | 25/05/2016 | A1 |
| **366** | Tartarugas | *Chondrilla* cf. *nucula* | Pendente | Pendente | 1 | 19/05/2016 | TM |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **367** | Cemitério | *Chondrilla* cf. *nucula* | 3° 52´ 09.6´´ | 33° 49´ 00.4´´ | 0,4 | 17/05/2016 | TM |
| **368** | Cemitério | *Chondrilla* cf. *nucula* | 3° 52´ 09.6´´ | 33° 49´ 00.4´´ | 0,2 | 17/05/2016 | TM |
| **371** | Rocas | *Chondrilla* cf. *nucula* | Pendente | Pendente | 0,5 | 25/05/2016 | TM |
| **372** | Rocas | *Chondrilla* cf. *nucula* | Pendente | Pendente | 0,5 | 25/05/2016 | TM |
| **373** | Tartarugas | *Trididemnum maragogi* | Pendente | Pendente | 1 | 19/05/2016 | TM |
| **374** | Falsa barreta | *Chondrilla* cf. *nucula* | 3° 51´ 37.1´´ | 33° 49´ 07.4´´ | 1 | 24/05/2016 | SWA |
| **375** | Salão | *Plakortis sp.* | Pendente | Pendente | 6 | 23/05/2016 | A1 |
| **383** | Salão | *Plakinastrella microspiculifera* | Pendente | Pendente | 6 | 23/05/2016 | A1 |
| **385** | Cemitério | *Chondrilla* cf. *nucula* | 3° 52´ 09.6´´ | 33° 49´ 00.4´´ | 0,4 | 17/05/2016 | SWA |
| **386** | Salão | *Plakinastrella microspiculifera* | Pendente | Pendente | 6 | 23/05/2016 | SWA |
| **388** | Barretão | Sedimento 5 | Pendente | Pendente | 5 | 12/05/2016 | A1 |
| **391** | Tartarugas | *Trididemnum maragogi* | Pendente | Pendente | 1 | 19/05/2016 | TM |
| **392** | Farol 1 | Sedimento 10 | Pendente | Pendente | 1 | 21/05/2016 | TM |
| **393** | Farol II | Sedimento 7 | 3° 51´ 23.1´´ | 33° 51´ 23.1´´ | 2 | 21/05/2016 | TM |
| **397** | Tartarugas | *Chondrilla* cf. *nucula* | Pendente | Pendente | 1 | 19/05/2016 | A1 |
| **398** | Farol 1 | Sedimento 10 | Pendente | Pendente | 1 | 21/05/2016 | TM |
| **399** | Falsa barreta | *Chondrilla* cf. *nucula* | 3° 51´ 37.1´´ | 33° 49´ 07.4´´ | 1 | 24/05/2016 | SWA |
| **405** | Cemitério | *Trididemnum maragogi* | 3° 52´ 09.6´´ | 33° 49´ 00.4´´ | 0,2 | 16/05/2016 | A1 |
| **406** | Cemitério | *Trididemnum maragogi* | 3° 52´ 09.6´´ | 33° 49´ 00.4´´ | 0,5 | 16/05/2016 | SWA |
| **407** | Cemitério | *Trididemnum maragogi* | 3° 52´ 09.6´´ | 33° 49´ 00.4´´ | 0,2 | 16/05/2016 | SWA |
| **412** | Tartarugas | *Trididemnum maragogi* | Pendente | Pendente | 1 | 19/05/2016 | SWA |
| **413** | Salão | *Plakinastrella microspiculifera* | Pendente | Pendente | 6 | 23/05/2016 | SWA |
| **414** | Cemitério | *Trididemnum maragogi* | 3° 52´ 09.6´´ | 33° 49´ 00.4´´ | 0,2 | 16/05/2016 | SWA |
| **415** | Cemitério | *Trididemnum maragogi* | 3° 52´ 09.6´´ | 33° 49´ 00.4´´ | 0,5 | 16/05/2016 | SWA |
| **455** | Salão | Sedimento 6 | Pendente | Pendente | 8 | 23/05/2016 | SWA |
| **456** | Podes crer | Sedimento 2 | Pendente | Pendente | 2,7 | 28/05/2016 | SWA |
| **457** | Podes crer | Sedimento 2 | Pendente | Pendente | 2,7 | 28/05/2016 | SWA |
| **458** | Podes crer | Sedimento 2 | Pendente | Pendente | 2,7 | 28/05/2016 | SWA |
| **408** | Barretão | Sedimento 5 | Pendente | Pendente | 5 | 12/05/2016 | A1 |
| **417** | Âncoras | Sedimento 3 | 3° 52´ 10.1´´ | 33° 48´ 10.6´´ | 1,3 | 9/05/2016 | SWA |
| **418** | Âncoras | Sedimento 3 | 3° 52´ 10.1´´ | 33° 48´ 10.6´´ | 1,3 | 9/05/2016 | SWA |
| **462** | Cemitério | *Trididemnum maragogi* | 3° 52´ 09.6´´ | 33° 49´ 00.4´´ | 0,2 | 16/05/2016 | SWA |
| **463** | Rocas | *Chondrilla* cf. *nucula* | Pendente | Pendente | 0,5 | 25/05/2016 | A1 |
| **466** | Salão | *Plakortis sp.* | Pendente | Pendente | 6 | 23/05/2016 | TM |
| **468** | Falsa barreta | *Plakortis sp.* | 3° 51´ 37.1´´ | 33° 49´ 07.4´´ | 1 | 24/05/2016 | SWA |
| **474** | Cemitério | *Chondrilla* cf. *nucula* | 3° 52´ 09.6´´ | 33° 49´ 00.4´´ | 0,4 | 17/05/2016 | SWA |
| **475** | Podes crer | Sedimento 2 | Pendente | Pendente | 2,7 | 28/05/2016 | SWA |
| **476** | Falsa Barreta | Sedimento 9 | 3° 51´ 37.1´´ | 33° 49´ 07.4´´ | 2 | 11/05/2016 | SWA |
| **501** | Cemitério | *Trididemnum maragogi* | 3° 52´ 09.6´´ | 33° 49´ 00.4´´ | 0,5 | 16/05/2016 | SWA |
| **502** | Cemitério | *Trididemnum maragogi* | 3° 52´ 09.6´´ | 33° 49´ 00.4´´ | 0,5 | 16/05/2016 | SWA |
| **503** | Cemitério | *Trididemnum maragogi* | 3° 52´ 09.6´´ | 33° 49´ 00.4´´ | 0,5 | 16/05/2016 | SWA |
| **504** | Cemitério | *Trididemnum maragogi* | 3° 52´ 09.6´´ | 33° 49´ 00.4´´ | 0,5 | 16/05/2016 | SWA |

**ANEXO 2.** Ensaio de MTT em células HCT-116. Citotoxicidade dos extratos obtidos das bactérias procedentes de ascídias, esponjas e sedimentos do Atol das rocas.

| | Citotoxicidade (%) | | | Citotoxicidade (%) | |
|---|---|---|---|---|---|
| **BRB** | **5 µg/mL** | **50 µg/mL** | **BRB** | **5 µg/mL** | **50 µg/mL** |
| **256** | 47,4 | 94,89 | **371** | 33,54 | 36,76 |
| **283** | 25,3 | 64,82 | **372** | 11,16 | 14,34 |
| **284** | 64,43 | 91,43 | **373** | 19,92 | 43,91 |
| **285** | 67.9 | 70 | **374** | 22 | 49 |
| **288** | 31,64 | 57,37 | **375** | 22,1 | 51,15 |
| **297** | -4,85 | 16,56 | **383** | 2,96 | 68,93 |
| **298** | 99,34 | 99,97 | **385** | 23,43 | 56,04 |
| **301** | 24,51 | 40,19 | **386** | 51,21 | 65,49 |
| **302** | 100,01 | 100,52 | **388** | 16,06 | 41,99 |
| **304** | -13,7 | 67,43 | **391** | 85,11 | 101,68 |
| **306** | -0,23 | 60,76 | **392** | 4,55 | 49,71 |
| **307** | 8,19 | 52,08 | **393** | -5,14 | 6,31 |
| **308** | 0,85 | 50,38 | **397** | 35,89 | 92,4 |
| **309** | 6,81 | 40,57 | **398** | 2,08 | 16,5 |
| **311** | 15,54 | 44,79 | **399** | 69,93 | 82,96 |
| **314** | 15,75 | 55,1 | **405** | 14,36 | 68,66 |
| **320** | 69,12 | 96,37 | **406** | 73,28 | 94,78 |
| **324** | 18,44 | 50,69 | **407** | 80,94 | 92,93 |
| **326** | -7,95 | -3,02 | **408** | 88,94 | 100,97 |
| **346** | 20,37 | *30,98* | **412** | 9,45 | 46,35 |
| **348** | 22,28 | 89,33 | **413** | 95,48 | 99,7 |
| **349** | 24 | 76,09 | **414** | 86,52 | 98,86 |
| **350** | 81,03 | 97,24 | **415** | 64,51 | 97,97 |
| **351** | 22,16 | 69,92 | **417** | 17,21 | 95,73 |
| **352** | 67,19 | 87,94 | **418** | 34,44 | 98,88 |
| **353** | 44,71 | 51,68 | **455** | 12 | 35 |
| **354** | 23,34 | 71,2 | **456** | 21,04 | 71,98 |
| **355** | 30,8 | 77,98 | **457** | 23,19 | 67,36 |
| **356** | 79,47 | 91,72 | **458** | 14,63 | 27,64 |
| **357** | 20,86 | 73,69 | **462** | 75,39 | 92,81 |
| **358** | 71,65 | 86,33 | **463** | 31,01 | 51,55 |
| **359** | 27,63 | 56,85 | **466** | 21,42 | 49,35 |
| **360** | 18,97 | 35,74 | **468** | 61,19 | 94,04 |
| **361** | 3,01 | 5,49 | **474** | 35,91 | 47,07 |
| **362** | -4,75 | 3,78 | **475** | 12,9 | 39,16 |
| **363** | 28,38 | 59,91 | **476** | 30,23 | 37,13 |
| **364** | 18,98 | 88,22 | **501** | 10,55 | 105,82 |
| **366** | 56,6 | 67,45 | **502** | 9,8 | 32,44 |
| **367** | 22,63 | 42,99 | **503** | 9,19 | 106,17 |
| **368** | 37,27 | 98,15 | **504** | 51,46 | 82,73 |

**ANEXO 3.** Rede molecular complete. Metabólitos presentes em extratos citotoxicos e com baixo nível de citotoxicidade.