

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: Prof^ª. 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: Prof^ª. Dra. Leticia V. Costa-Lotufo

São Paulo

2018

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 ($\geq 75\%$ de inibição na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$) 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: Metabólitos 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 ($\geq 75\%$ of inhibition at $50\mu\text{g/mL}$) 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.

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 características 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 específicas, 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 orchestra 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 características químicas das substâncias, pode-se observar que 48% são alcalóides indólicos, seguido de alcalóides pirrólicos com 18%, alcalóides β -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*, respectivamente (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 simbiotes, calculando-se que o 40% do volume total das esponjas podem ser ocupadas por estes. Além disso, tem sido proposto que os microrganismos simbiotes 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-mitóticos sobre as células deste tipo de tumores (62 e 61).

A brentuximabe 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 características ecológicas

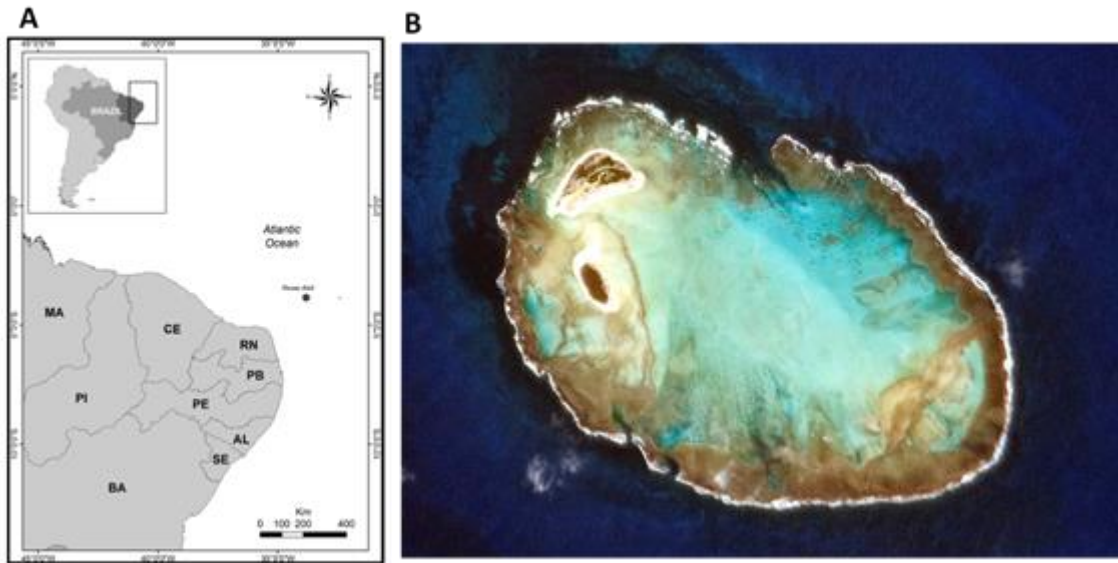
O Brasil possui um litoral marinho com uma extensão aproximada de 8.500km, mais de 3,5 milhões de km² de zona econômica exclusiva (ZEE) e 2,5 milhões de hectares em regiões com rios desembocando nos mares, misturando-se água doce com salgada conhecidos como estuários (9, 5), favorecendo a biodiversidade 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 $3^{\circ} 51'S$ e $33^{\circ} 49'W$, 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 km² 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, conseqüentemente, 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.

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, Borrallho 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. Ascidiens 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.