



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO



Estudo metabolômico de bactérias marinhas: avaliação das atividades larvicida e citotóxica de seus extratos

Eduarda Antunes Moreira

Ribeirão Preto
2022

EDUARDA ANTUNES MOREIRA

Estudo metabolômico de bactérias marinhas: avaliação das atividades larvicida e citotóxica de seus extratos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutora em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientador: Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 04/11/2022. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2022

RESUMO

MOREIRA, E. A. **Estudo metabolômico de bactérias marinhas: avaliação das atividades larvicida e citotóxica de seus extratos.** 2022. 71f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

O ambiente marinho cobre aproximadamente 70% da superfície da Terra e seus componentes desenvolvem capacidades metabólicas e fisiológicas únicas, o que culmina na produção de compostos com grande diversidade química e potencial biotecnológico. Devido à imensidão desta biosfera, a maior parte dos microrganismos que nela habitam ainda permanece inexplorada. Ainda assim, milhares de substâncias com amplo espectro de atividades biológicas e propriedades medicinais proeminentes já foram isolados a partir destes organismos, que seguem sendo consideradas as fontes mais promissoras para a descoberta de novos compostos químicos e terapêuticos. A partir daí, e considerando que anualmente milhões de novos casos de câncer e de infecção por dengue são reportados ao redor do mundo - muitos destes resultando em morte – o objetivo deste projeto foi buscar substâncias potencialmente ativas contra linhagens de células tumorais de cólon (HCT 116) e/ou contra larvas L3 do mosquito *Aedes aegypti* em extratos provenientes de bactérias marinhas. Para isso, buscou-se determinar o perfil metabólico destas bactérias a partir da aplicação de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em sequência (CLAE-EM/EM) e ferramentas computacionais de desreplificação disponíveis na plataforma *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS). Foram analisadas 266 cepas isoladas a partir de sedimento no litoral do estado de São Paulo, na Antártica e no mar profundo do sudeste brasileiro, de ascídias encontradas no Atol das Rocas e de cnidários encontrados no litoral paulista. Inicialmente, os extratos preparados a partir destas bactérias foram analisados por CLAE-EM/EM e submetidos a ensaios biológicos para o teste das duas atividades em questão. Os resultados obtidos a partir dos ensaios biológicos mostram que 19% dos extratos analisados apresentaram atividade larvicida contra o *Aedes aegypti*, e 35% apresentaram atividade citotóxica diante da linhagem de células tumorais de cólon. Na análise química das cepas que apresentaram atividade larvicida foi possível observar uma relação entre a taxonomia e o perfil químico dos microrganismos coletados em regiões próximas, além da presença de compostos potencialmente ativos pertencentes a diferentes classes químicas, especialmente lipopetídeos e terpenos. Na busca por compostos citotóxicos foi possível reafirmar a importância dos derivados indolcarbazólicos, com a observação tanto de estruturas conhecidas e comumente observadas, como a estaurosporina, quanto de derivados menos estudados, como as holirinas, em extratos considerados ativos. Uma análise das cepas em relação aos seus locais de coleta indicou, ainda, que a origem geográfica dos microrganismos também pode interferir em seu perfil metabólico. Por fim, as ferramentas do GNPS indicaram uma grande diversidade de metabólitos secundários produzidos pelas cepas estudadas, apontando para a predominância de compostos esteroidais e peptídeos cíclicos entre as classes químicas observadas.

Palavras-chave: microrganismos marinhos, metabolômica, inseticida, anticâncer

ABSTRACT

MOREIRA, E. A. **Marine bacteria metabolomics: evaluation of larvicidal and cytotoxic activities of their extracts.** 2022. 71f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

The marine environment covers approximately 70% of the Earth's surface and its components develop unique metabolic and physiological capabilities, which culminate in the production of compounds with great chemical diversity and biotechnological potential. Due to this biosphere's greatness, most of the microorganisms that inhabit it remain unexplored. Nevertheless, thousands of substances with a broad spectrum of biological activities and outstanding medicinal properties have already been isolated from these organisms, which continue to be considered the most promising sources for the discovery of new chemical and therapeutic compounds. Considering that and the fact that, annually, millions of new cases of cancer and dengue infection are reported around the world - many of them resulting in death – the main objective of this project was to search for substances potentially active against a colon tumor cell line (HCT 116) and/or against L3 larvae of the *Aedes aegypti* mosquito in marine bacteria extracts. Aiming that, the metabolic profile of these bacteria was determined through the application of liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) and computational dereplication tools available on the Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) platform. A total of 266 strains isolated from sediments on the coast of São Paulo state, in Antarctica and in the deep sea of southeastern Brazil, from ascidians found in Rocas Atoll and from cnidarians found in the coast of São Paulo, were used in this study. Initially, the extracts prepared from these bacteria were analyzed by HPLC-MS/MS and submitted to biological assays to test the biological activities of interest. The results obtained from the biological assays show that 19% of the analyzed extracts showed larvicidal activity against *Aedes aegypti*, and 35% showed cytotoxic activity against the colon tumor cell line. In the chemical analysis of the larvicidal strains, a relationship between the taxonomy and the chemical profile of microorganisms collected in the same region was observed, in addition to the presence of potentially active compounds belonging to different chemical classes, especially lipopeptides and terpenes. In the search for cytotoxic compounds, it was possible to reaffirm the importance of indolecarbazole derivatives, with the observation of known and commonly observed structures, such as staurosporine, and less studied derivatives, such as holyrines, in extracts considered active. The analysis of the strains relatively to their collection sites indicated that the geographic origin of the microorganisms can also interfere with their metabolic profile. Finally, the GNPS tools indicated a great diversity of secondary metabolites produced by the studied strains, pointing to the predominance of steroidal compounds and cyclic peptides among the observed chemical classes.

Keywords: marine microorganisms, metabolomics, insecticide, anticancer

1. INTRODUÇÃO

1.1. Análises metabolômicas

As análises metabolômicas, em teoria, são estudos através dos quais são detectados todos os metabólitos presentes em extratos complexos - mais especificamente, todas as substâncias com massa molecular abaixo de 2000 Da. No entanto, na prática isso não se aplica, uma vez que ainda não existe um método único de extração, ionização ou detecção que permita acessar o metaboloma completo dos indivíduos (BAUERMEISTER *et al.*, 2021; BRUNETTI *et al.*, 2018; ERNST *et al.*, 2014). Diante disso, uma abordagem possível é a determinação do perfil metabólico, que consiste na identificação de todos os metabólitos presentes em um extrato de origem natural possíveis de serem detectados frente aos métodos de processamento e análise de amostra utilizados. Assim, estes metabólitos são como uma impressão digital da complexa interação existente entre o genoma e o ambiente (HUBERT; NUZILLARD; RENAULT, 2017; VIANT *et al.*, 2017).

No geral, as principais etapas de um estudo metabolômico incluem: aquisição dos espectros, pré-processamento e organização visual dos dados, anotação de compostos ou classes químicas conhecidas, além de análises multivariadas supervisionadas ou não-supervisionadas (BAUERMEISTER *et al.*, 2021) (Figura 1). Para isso, além das ferramentas analíticas de separação e detecção, são utilizados também recursos computacionais e estatísticos que auxiliam na interpretação da grande quantidade de dados gerados (DEMARQUE *et al.*, 2020).

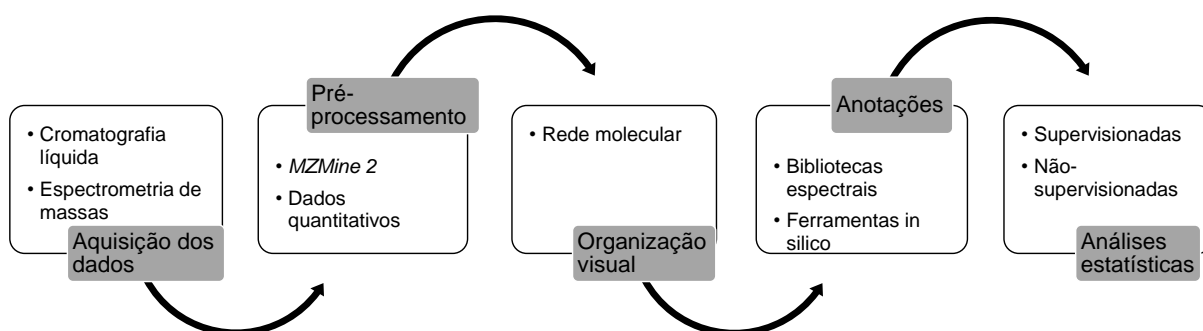


Figura 1. Principais etapas de um estudo metabolômico (adaptado de Bauermeister *et al.*, 2021).

1.1.1. Ferramentas analíticas para a desrepliação de extratos

O processo de desrepliação, que no início dos anos 90 era definido apenas como a “rápida identificação de quimiotipos conhecidos” (BEUTLER *et al.*, 1990), hoje é um campo de estudos que abrange áreas tão diversas quanto farmacologia, química, biologia molecular, biotecnologia, microbiologia e tecnologia de alimentos. Com o desenvolvimento de novas ferramentas e abordagens multidisciplinares, a desrepliação se tornou tema central na busca por compostos de origem natural com potencial aplicação biotecnológica ou industrial, principalmente a partir do ano de 2012. Mesmo diante da grande diversidade de estratégias descritas na literatura, há um consenso de que este processo tem como principal finalidade acelerar a descoberta de substâncias inéditas a partir do melhoramento dos métodos de caracterização, além de reduzir o reisolamento de substâncias já conhecidas. Assim, seu desenvolvimento conta, principalmente, com tecnologias para a separação e detecção de substâncias, além da construção de bases de dados estruturais e espectrais abrangentes (GAUDÊNCIO; PEREIRA, 2015; HUBERT; NUZILLARD; RENAULT, 2017).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é reconhecida, desde o início dos anos 80, como a ferramenta mais versátil para a separação de substâncias de origem natural a partir de extratos brutos ou frações polares. Geralmente as separações são realizadas em fase reversa, com fase estacionária C18, metanol:água ou acetonitrila:água como eluentes, e em modo gradiente (WOLFENDER, 2009). Quando acoplada à espectrometria de massas (EM), ambas fornecem as maiores vantagens das duas técnicas: alta seletividade, eficiência de separação e obtenção de informações estruturais, como massa, fórmula molecular e perfil de fragmentação (VÉKEY, 2001). Assim, a caracterização de extratos complexos torna-se um processo muito mais rápido e eficaz, com a detecção de centenas - ou mesmo milhares - de compostos em minutos (JOHNSON; CARLSON, 2015).

Na espectrometria de massas, uma das fontes de ionização mais utilizadas é a fonte de ionização por electrospray (IES-EM). Nela, o fluxo efluente da coluna da CLAE é nebulizado através de um capilar carregado, resultando em gotas a partir das quais o solvente é evaporado até a liberação dos íons gerados, que serão direcionados ao analisador (FENN *et al.*, 1990). Entre os diversos tipos de

analisadores disponíveis, o *time-of-flight* (TOF) se destaca por possuir alta resolução e determinar a massa dos íons precursores (EM^1) com exatidão. Desta forma, a espectrometria de massas pode ser utilizada para a determinação das fórmulas moleculares das substâncias em análise (VÉKEY, 2001).

Quando o TOF é combinado a um analisador Quadrupolo, por exemplo, este acoplamento permite a análise de espectrometria de massas em sequência (EM/EM ou EM^2), na qual os íons precursores de interesse são selecionados e fragmentados (VÉKEY, 2001). No método de fragmentação conhecido como *collision-induced dissociation* (CID), os íons precursores colidem com um gás inerte (geralmente nitrogênio ou hélio) transferindo sua energia interna, até que ocorra a quebra das ligações (JOHNSON; CARLSON, 2015). Os fragmentos gerados são, então, analisados, fornecendo informações estruturais mais detalhadas, com base nas eliminações neutras causadas por ativação colisional (DEMARQUE *et al.*, 2016).

A espectrometria de massas aplicada à detecção de compostos para a desreplicação de extratos pode ser aplicada de duas formas distintas, através da utilização de métodos alvo ou não-alvo. Os métodos alvo tem como objetivo a detecção e análise de um determinado composto ou uma classe de compostos predefinidos, sendo mais restritos, sensíveis e quantitativos. Por outro lado, os métodos não-alvo buscam compreender o perfil químico dos extratos de forma mais abrangente, favorecendo a análise de uma maior variedade de compostos e possibilitando, inclusive, a detecção de substâncias inesperadas ou inéditas (MELNIK *et al.*, 2017). A interpretação de análises não-alvo, no entanto, deve ser realizada com cautela, uma vez que os resultados podem ser mais afetados pelos protocolos de coleta, extração e preparo de amostras, além das ferramentas analíticas (BAUERMEISTER *et al.*, 2021). Uma das principais aplicações de métodos não-alvo são estudos metabolômicos baseados em espectrometria de massas.

1.1.2. Pré-processamento e organização dos dados

A etapa de pré-processamento dos dados espectrais experimentais é essencial para a obtenção de informações quantitativas que virão a ser utilizadas nas análises estatísticas. Uma das ferramentas bastante utilizada para este fim é o *MZmine 2* - um software de livre acesso dividido em módulos que permitem: importação e processamento de dados; detecção dos picos de EM; construção e deconvolução de

cromatogramas; agrupamento e filtragem de isótopos; detecção e alinhamento de sinais cromatográficos, além da normalização e aplicação de análises estatísticas nos dados processados (KATAJAMAA; MIETTINEN; OREŠIČ, 2006; PLUSKAL *et al.*, 2010) (Figura 2). Assim, com esta plataforma, os usuários podem otimizar diversos parâmetros e visualizar os resultados a cada etapa (NOTHIAS *et al.*, 2020), obtendo, ao final do processamento, a separação adequada de compostos isômeros, anotações com fórmulas químicas calculadas e as abundâncias de íons precursores para quantificação relativa entre amostras (OLIVON *et al.*, 2017).

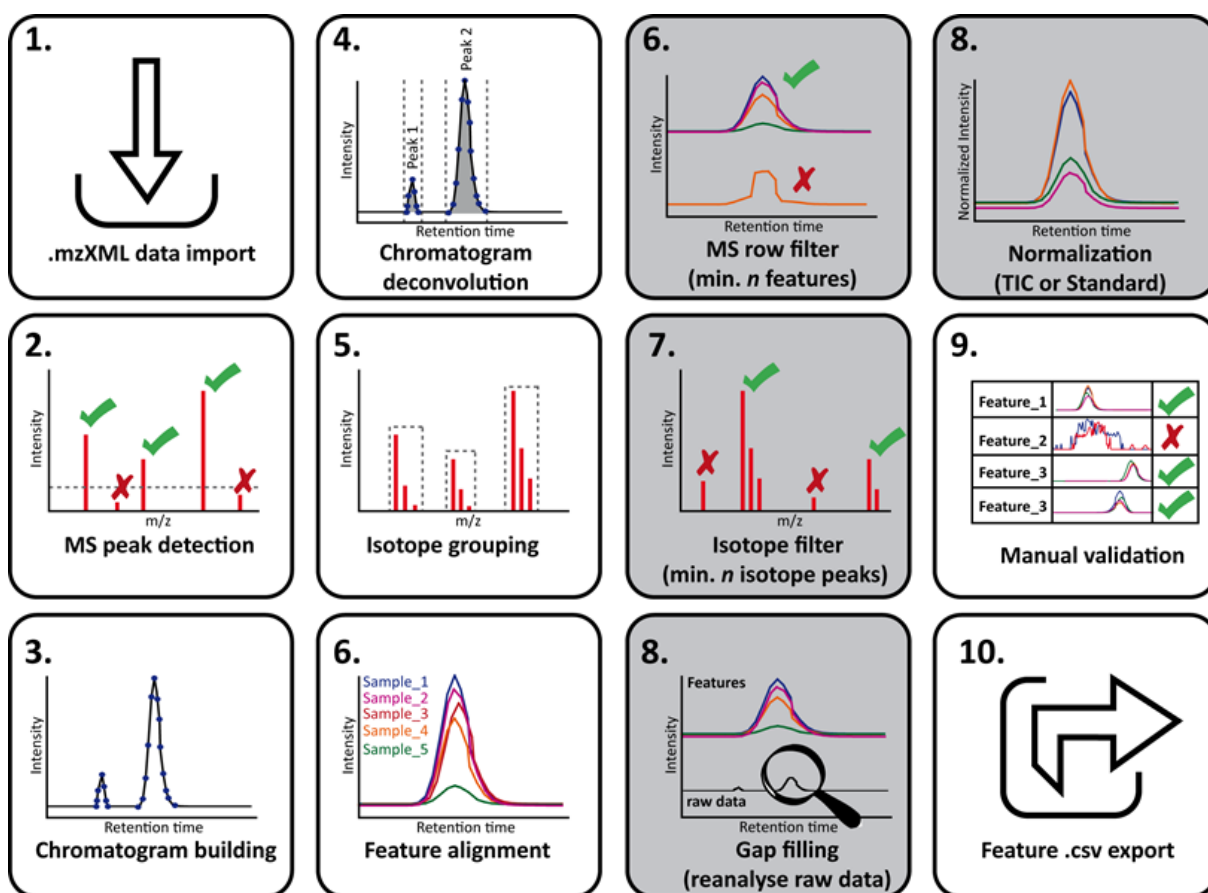


Figura 2. Módulos disponíveis no software *MZmine 2* para o pré-processamento de dados espectrais por Daniel Petras. Disponível em: <https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/featurebasedmolecularnetworking-with-mzmine2/>

Para a organização do grande volume de dados de EM/EM adquiridos - seja a partir de dados pré-processados, ou mesmo dos dados brutos - podem ser construídas redes moleculares (do inglês, *Molecular Networking* - MN): uma correlação espectral e ferramenta de visualização que pode detectar espectros consenso de substâncias relacionadas a partir da semelhança de seus perfis de fragmentação, mesmo quando estes não correspondem a um composto conhecido (WANG *et al.*, 2016). Nesta

abordagem computacional, cada espectro consenso, que é resultado do alinhamento de espectros EM¹ e EM² similares, é representado como um nodo referente a uma substância (DUNCAN *et al.*, 2015). Substâncias pertencentes a uma mesma classe química ou com semelhanças estruturais compartilham espectros EM² similares (YANG *et al.*, 2013) e, a partir do nível de similaridade (cosseno) entre seus espectros de fragmentação, os nodos são agrupados dentro de um mesmo *cluster*. Ainda no processo de análise e edição da rede molecular, é possível relacionar os dados de massa com outras informações como abundância, origem ou atividade biológica de cada substância detectada. Estas características podem ser representadas pelo tamanho ou pela cor de cada nodo (WANG *et al.*, 2016), utilizando-se um software de edição, como o *Cytoscape*[®]. Assim, esta abordagem permite que sejam realizadas comparações de alto rendimento e consiste em um método rápido para a organização dos dados, tornando o processo de desreplicação mais objetivo e econômico (YANG *et al.*, 2013).

1.1.3. Anotação de compostos e classes químicas

A identificação de metabólitos é fundamental para a transformação de dados brutos em informações biologicamente significativas, sendo um ponto crítico dos estudos metabolômicos (SUMNER *et al.*, 2007). Somente quando se extrapola a discussão de picos desconhecidos para a anotação ou identificação de metabólitos é que se possibilita a especulação de vias metabólicas e interações ecológicas envolvidas na construção do metaboloma analisado, por exemplo. No entanto, mesmo com a evolução dos métodos analíticos, esta etapa ainda se apresenta como um dos principais gargalos da metabolômica: em consequência da grande quantidade e complexidade dos dados, a análise manual e individual de espectros torna-se impraticável (BAUERMEISTER *et al.*, 2021; VIANT *et al.*, 2017).

Diante disso, a *Metabolomics Standards Initiative* (MSI), uma iniciativa internacional que visa à padronização de dados de metabolômica com o objetivo de facilitar a troca de informações (FIEHN *et al.*, 2007), definiu um espectro entre identificação e anotação de compostos, com diferentes níveis de validação analítica (VIANT *et al.*, 2017). Ao todo, foram definidos cinco níveis, sendo o Nível 0 o mais rigoroso, referente à identificação e determinação da estrutura tridimensional da substância em questão. O Nível 1, referente a “Composto Identificado”, dependente

da aplicação de pelo menos duas técnicas analíticas e comparação com dados de um padrão de referência. O Nível 2 se refere a “Composto Supostamente Anotado”, quando não há comparação com padrão de referência, mas sim com propriedades físico-químicas e/ou bibliotecas espectrais. O Nível 3 abrange “Classes de Compostos Supostamente Anotadas”, baseado em comparações com propriedades físico-químicas e/ou dados espectrais descritos para classes químicas conhecidas. Por fim, o Nível 4 refere-se a “Compostos Desconhecidos”, quando os dados espectrais são obtidos e podem ser utilizados para diferenciação ou quantificação, mas não há informação suficiente na literatura para sua anotação (BLAŽENOVIC *et al.*, 2018; SUMNER *et al.*, 2007).

Hoje estão disponíveis diversos recursos que auxiliam no processo de anotação, desde bibliotecas espectrais (MSI Nível 2), até softwares e ferramentas *in silico*, que apontam estruturas ou classes químicas candidatas com base nos dados de EM¹ e fragmentação (MSI Níveis 2 e 3) (BAUERMEISTER *et al.*, 2021).

1.1.4. Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS)

O *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS) é uma plataforma online e de acesso público que compreende uma vasta biblioteca de espectros de EM², além de várias ferramentas computacionais para auxiliar na análise de dados. Sendo assim, esta plataforma viabiliza a construção de redes moleculares e a anotação dos espectros presentes nas redes geradas (WANG *et al.*, 2016).

Dentro desta plataforma é possível, por exemplo, construir redes moleculares a partir dos dados experimentais brutos, utilizando o *Classical Molecular Networking* (MN Clássico), ou a partir dos dados pré-processados, utilizando o *Feature Based Molecular Networking* (FBMN). As duas funções possuem a mesma base para a construção das redes (descrita no tópico 1.1.2) diferindo principalmente no formato dos dados inseridos. O método MN Clássico é executado inteiramente na plataforma GNPS: os espectros EM² são agrupados com o *MS-Cluster* e os espectros de consenso obtidos são usados para a construção da rede molecular. Para o FBMN o usuário primeiro aplica o pré-processamento, utilizando um software como o *MZmine 2*, cujos resultados são exportados como uma tabela de dados quantitativos (formato .txt), referentes às áreas dos picos de cada metabólito detectado, também chamados de *feature*, e uma lista de espectros de fragmentação (formato .mgf). Estes dois

arquivos são, então, carregados na plataforma do GNPS para a construção da rede molecular (NOTHIAS *et al.*, 2020).

A plataforma ainda disponibiliza ferramentas *in silico* que podem auxiliar na anotação de compostos, para além da comparação com sua biblioteca espectral. Alguns exemplos destas ferramentas são: *Network Annotation Propagation* (NAP) - integra desrepliação variável e fragmentação combinatória para anotação de análogos em redes moleculares; *DEREPLICATOR* - anota peptídeos com base em espectros de fragmentação hipotéticos gerados a partir de estruturas presentes em bancos de dados de produtos naturais peptídicos (PNP); *MS2LDA* - reconhece subestruturas e sua co-ocorrência em um conjunto de dados EM²; *MolNetEnhancer* - utiliza informações de subestrutura, juntamente com o algoritmo *ClassyFire*[®], para classificar os grupos químicos presentes no conjunto de dados (BAUERMEISTER *et al.*, 2021).

1.1.5. Análises estatísticas multivariadas

Na investigação de produtos naturais ativos utilizando análises metabolômicas, a busca por padrões que indiquem que uma atividade biológica resulta de características particulares de determinados compostos é bastante desafiadora, principalmente diante da quantidade e da complexidade de informações adquiridas (BOUFRIDI; QUINN, 2016). Neste sentido, as análises estatísticas multivariadas são de grande valia, sendo divididas em duas principais categorias: análises estatísticas multivariadas não-supervisionadas e supervisionadas (BAUERMEISTER *et al.*, 2021).

Os métodos não-supervisionados geralmente são aplicados para explorar um conjunto de dados de forma mais abrangente, buscando tendências e agrupamentos, e contribuindo com uma visão imparcial dos dados (YI *et al.*, 2016). A Análise de Componentes Principais (PCA) é o principal método desta categoria aplicado em análises metabolômicas, e tem como objetivo preservar as características essenciais dos dados, apresentando-os em menos dimensões (PAUL; HARRINGTON, 2021). Outro método não-supervisionado utilizado na metabolômica é a Análise de Coordenadas Principais (PCoA), que é bastante similar ao PCA, porém comumente utilizada na análise de dados aplicando métricas de distância diferentes da utilizadas na PCA (CAO *et al.*, 2016).

As análises multivariadas supervisionadas, por sua vez, são aplicadas a conjuntos de dados aos quais são atribuídos rótulos ou classes. Um dos principais métodos desta categoria é a Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA), que modela a variância dentro de um conjunto de dados discriminando estatisticamente grupos de observações (PAUL; HARRINGTON, 2021).

1.2. Produtos Naturais Marinhos (PNM)

O ambiente marinho cobre aproximadamente 70% da superfície da Terra e representa uma vasta fonte de produtos naturais, possuindo fauna e flora amplamente diversificadas (SATPUTE *et al.*, 2010). Neste ecossistema, os seres vivos desenvolvem capacidades metabólicas e fisiológicas únicas para conseguir sobreviver em habitats extremos (sob alta pressão, alta concentração de sais e variações drásticas de temperatura, por exemplo) e produzem compostos que não são comumente produzidos por seres terrestres (GUDIÑA; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2016), apresentando grande diversidade química e potencial biotecnológico (KÜGLER *et al.*, 2015).

A exploração deste ambiente teve início na década de 50, a partir de uma espécie de esponja marinha (*Tethya cripta*) e de outras espécies mais facilmente encontradas e coletadas, como algas e corais. Com o desenvolvimento de melhores equipamentos de mergulho e coleta de amostras, o universo subaquático se tornou mais acessível, e novas espécies e estruturas químicas puderam ser descritas (GERWICK; MOORE, 2012). Os microrganismos encontrados no sedimento ou em simbiose com outras espécies também se tornaram material de análise e, a partir daí, foi possível observar que muitas das substâncias de interesse encontradas nos extratos provenientes dos macrorganismos eram, na realidade, produzidas por bactérias ou microalgas (MINCER *et al.*, 2002; PIEL, 2009).

Devido à imensidão da biosfera marinha, a maior parte dos microrganismos que nela habitam ainda permanece inexplorada. Estima-se que menos de 0,1% do total das bactérias marinhas existentes foi investigado (GUDIÑA; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2016; SATPUTE *et al.*, 2010). No Brasil, de acordo com Lôca e seus colaboradores, até 2014 os compostos derivados de microrganismos de ambiente marinho encontrados em sedimento, algas e/ou invertebrados, representavam apenas 14% das substâncias inéditas isoladas a partir de fungos e bactérias, enquanto compostos

produzidos por microrganismos encontrados em plantas, representavam 66% do total (IÓCA; ALLARD; BERLINCK, 2014).

Mesmo diante deste potencial subexplorado, milhares de substâncias com amplo espectro de atividades biológicas e propriedades medicinais proeminentes já foram isolados a partir de microrganismos marinhos, e as bactérias e o ambiente marinho seguem sendo consideradas as fontes mais promissoras para a descoberta de novos compostos químicos e terapêuticos (KÜGLER *et al.*, 2015; NEWMAN; CRAGG, 2016).

1.2.1. PNM com atividade citotóxica

Entre as 136 pequenas moléculas aprovadas como medicamentos para o tratamento de diversos tipos de câncer entre 1981 até 2014, 83% são produtos naturais ou seus derivados (NEWMAN; CRAGG, 2016). Abordando especificamente compostos de origem natural isolados do ambiente marinho e seus derivados, um total de onze substâncias foram aprovadas para uso no tratamento de diversas doenças até 2019, sendo cinco delas utilizadas nos tratamentos de câncer: citarabina (Cytosar-U®), trabectedina (Yondelis®) e mesilato de eribulina (Halaven®), além dos conjugados anticorpo-medicação: brentuximabe vedotina (Adcetris®) e polatuzumabe vedotina (Polivy®) (LIANG; LUO; LUESCH, 2019) (Figura 3)

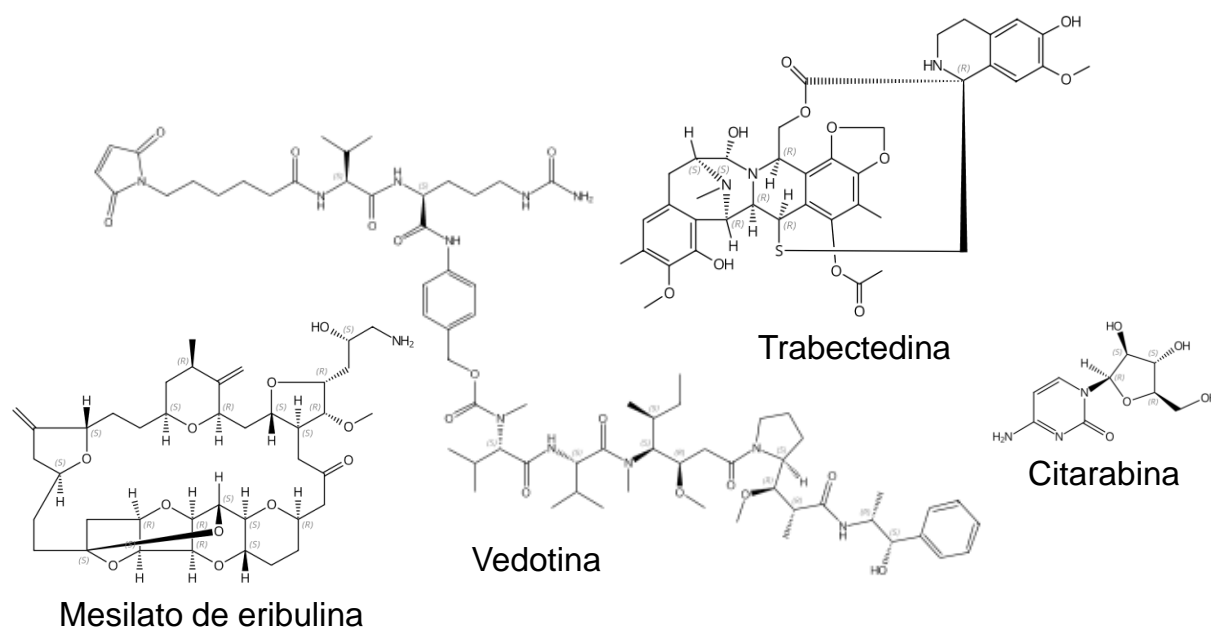


Figura 3. Estruturas químicas dos medicamentos derivados de produtos naturais marinhos e utilizados no tratamento de diversos tipos de câncer. Fonte: SciFinder.

Infelizmente, somente no ano de 2018, aproximadamente 18 milhões de novos casos de câncer foram reportados ao redor do mundo, resultando em cerca de 10 milhões de mortes. Mesmo com estudos e avanços na prevenção, diagnóstico e tratamento, esta doença ainda não possui uma terapia ideal, que seja capaz de contornar três principais dificuldades: a diversidade de tipos de tumores, o desenvolvimento de resistência às drogas utilizadas, e os graves efeitos colaterais (KHALIFA *et al.*, 2019; MATULJA *et al.*, 2020). Diante disso, muitos esforços continuam sendo direcionados para a busca de novos compostos ativos, capazes de superar estas questões.

Assim, a citotoxicidade *in vitro* tornou-se a principal atividade biológica testada para novos PNMs nas últimas décadas (HU *et al.*, 2015), jogando luz sobre diversas classes de compostos que vem se mostrando promissoras. As principais classes citadas em revisões disponíveis na literatura incluem: alcaloides, esteroides, glicosídeos, terpenoides, macrolídeos, polipeptídeos, quinonas, compostos fenólicos, lactonas e polissacarídeos. Estes metabólitos com potencial atividade antitumoral têm sido isolados a partir de animais invertebrados, algas, fungos e, principalmente, bactérias marinhas (KHALIFA *et al.*, 2019; MATULJA *et al.*, 2020). Os metabólitos produzidos por actinomicetos marinhos, especialmente cepas pertencentes aos gêneros *Streptomyces* e *Salinispora*, têm se mostrado bastante relevantes na triagem de substâncias citotóxicas (MATULJA *et al.*, 2020; SUBRAMANI; AALBERSBERG, 2012), assim como algumas espécies do gênero *Bacillus*, inclusive cepas isoladas em território brasileiro (VELASCO-ALZATE *et al.*, 2019).

1.2.2. PNM com atividade inseticida

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>) são estimadas, a cada ano, de 100 a 400 milhões de infecções por dengue, sendo que apenas os americanos relataram cerca de 3,1 milhões de casos. A dengue é a doença viral transmitida por mosquito que se espalha mais rápido pelo mundo. É causada por um vírus de RNA de fita simples que pertence ao gênero *Flavivirus* (Family Flaviviridae), sendo conhecidos quatro sorotipos da doença: DENV1 - 4. O Brasil é responsável por mais de 60% dos casos de dengue notificados no continente americano, tendo esta se tornado a principal doença transmitida por vetores do país (DE JESUS *et al.*, 2020).

Este cenário é agravado ainda mais pela ausência de vacinas eficazes contra o vírus e pela falta de medicamentos para combatê-lo (FADAKA *et al.*, 2021).

Por um longo período os artrópodes da família Culicidae foram negligenciados quando se considerava sua importância para a saúde pública, pois acreditava-se que apenas causavam desconforto aos humanos devido à sua picada. Porém, com o maior conhecimento das epidemias causadas principalmente por vírus das famílias Flaviviridae e Togaviridae, tal equívoco ficou evidente, e os Culicidae foram identificados como potenciais vetores de doenças virais graves, como dengue, Zika, febre amarela e Chikungunya (BRAACK *et al.*, 2018). Diante desta situação, a estratégia de controle da dengue tem como principal alvo o seu mosquito vetor (SILVÉRIO *et al.*, 2020).

Os produtos naturais têm se mostrado uma excelente fonte de metabólitos bioativos, incluindo novos biopesticidas, dada a biodiversidade de plantas e microrganismos a partir dos quais podem ser extraídos (DEMARQUE; ESPINDOLA, 2021). O gênero *Streptomyces* possui mais de 680 espécies de bactérias descritas e apresenta uma notável capacidade de produzir compostos com propriedades antibióticas, antifúngicas e antiparasitárias, além de substâncias com atividade inseticida. Derivados de pirrolisina isolados de *Streptomyces griseus* apresentam atividade inseticida (JIZBA *et al.*, 1992), enquanto o extrato bruto de *Streptomyces* sp. VITJS4 causou 100% de mortalidade ao mosquito *Aedes aegypti* (NAINE; DEVI, 2014). Existem, também, compostos produzidos por bactérias do gênero *Bacillus* com potente atividade inseticida e que podem inspirar o desenvolvimento de novos inseticidas de fontes naturais (SONG *et al.*, 2021). A variante *Bacillus thuringiensis* var. israelensis, por exemplo, mostrou-se ativa contra mosquitos, incluindo a espécie *A. aegypti* (WEINZIERL *et al.*, 2005). Ainda assim, é importante mencionar que os ambientes terrestres têm sido mais investigados com esse propósito do que os ecossistemas marinhos, que também são fontes bastante interessantes de compostos bioativos. Um exemplo digno de menção é que extratos derivados da bactéria *Streptomyces* encontrados em sedimentos marinhos da costa nordeste do Brasil podem produzir uma enorme quantidade de antibióticos e outros produtos naturais com potencial biomédico (FERREIRA *et al.*, 2016; VELASCO-ALZATE *et al.*, 2019).

Atualmente, há um desejo por novos compostos que possam controlar insetos vetores que apresentem a maioria das seguintes características: (I) específicos para o organismo alvo; (II) baixa persistência ambiental (alimento, solo e água); (III) baixos efeitos adversos sobre predadores humanos ou naturais; e (IV) capacidade reduzida de desenvolvimento de resistência pelo organismo alvo (SONG *et al.*, 2021). Neste contexto, o Projeto *ArboControl* Brasil, financiado pelo Ministério da Saúde entre os anos de 2016 e 2021, teve como um de seus objetivos testar extratos de plantas, microrganismos endofíticos, animais e microrganismos marinhos de biomas do Brasil e do mundo na busca por substâncias potencialmente ativas contra o mosquito *Aedes aegypti* e/ou suas formas imaturas, contando com a colaboração deste projeto nessa triagem.

2. CONCLUSÕES

Devido às situações ambientais extremas às quais estão constantemente expostos, os organismos marinhos, no geral, produzem metabólitos secundários bastante diversificados, o que confere importante potencial biotecnológico e farmacológico para estes seres vivos. Considerando especificamente as cepas de bactérias investigadas neste projeto, é possível inferir que o metaboloma destes microrganismos, de fato, apresenta uma diversa gama de compostos candidatos a auxiliarem na resolução de problemas relacionados à saúde humana.

Na análise das cepas que apresentaram atividade larvicida contra o *A. aegypti*, foi possível observar uma relação entre a taxonomia e o perfil químico dos microrganismos coletados em regiões próximas - esteroides, ácidos carboxílicos, quinolinas, benzenos e compostos organoxigenados foram produzidos, em geral, por actinobactérias, enquanto compostos peptidomiméticos, ácidos fosfóricos orgânicos, glicerofosfolipídios e compostos organonitrogenados foram produzidos por Firmicutes e proteobactérias - além da presença de compostos potencialmente ativos pertencentes a diferentes classes químicas, especialmente lipopetídeos e terpenos. Na busca por compostos citotóxicos, foi possível reafirmar a importância dos derivados indolcarbazólicos, com a detecção tanto de estruturas conhecidas e comumente observadas, como a estaurosporina, quanto de derivados menos estudados, como as holirinas, em extratos considerados ativos. A análise do perfil

químico das cepas em relação aos seus locais de coleta indicou, ainda, que a origem geográfica dos microrganismos também pode interferir em seu perfil metabólico.

As ferramentas computacionais que vêm sendo desenvolvidas para auxiliar no processamento de dados metabolômicos guiam a análise dos resultados adquiridos, auxiliando na compreensão da grande quantidade de informações com a qual se trabalha neste tipo de estudo. Aqui, as ferramentas disponíveis na plataforma do GNPS possibilitaram o reconhecimento da imensa diversidade de metabólitos secundários produzidos pelas bactérias marinhas em estudo - indicando uma maior presença de compostos esteroidais e peptídeos cíclicos - e o direcionamento da discussão para as classes de compostos potencialmente relacionados às atividades biológicas testadas. Ainda que haja limitações e diferenças entre as informações adquiridas a partir de ferramentas e abordagens distintas, é possível afirmar que o uso dos recursos disponíveis na plataforma do GNPS, juntamente com análises matemáticas e estatísticas, acelera o processo de desreplicação de extratos complexos ao processar e organizar os dados de forma bastante eficiente.

3. REFERÊNCIAS

ADAMEK, M.; ALANJARY, M.; SALES-ORTELLS, H.; GOODFELLOW, M.; BULL, A. T.; WINKLER, A.; WIBBERG, D.; KALINOWSKI, J.; ZIEMERT, N. Comparative genomics reveals phylogenetic distribution patterns of secondary metabolites in *Amycolatopsis* species. **BMC Genomics**, v. 19, n. 1, p. 1–15, 2018.

ANDRÉO, M. A.; JIMENEZ, P. C.; SIEBRA, J. B. C. N.; COSTA-LOTUFO, L. V.; VESSECCHI, R.; NIEHUES, M.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Systematic UPLC-ESI-MS/MS study on the occurrence of staurosporine and derivatives in associated marine microorganisms from *Eudistoma vannamei*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 2, p. 335–343, 2012.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, n. 5, p. 495–508, 2000.

BAUERMEISTER, A.; MANNOCHIO-RUSSO, H.; COSTA-LOTUFO, L. V.; JARMUSCH, A. K.; DORRESTEIN, P. C. Mass spectrometry-based metabolomics in microbiome investigations. **Nature Reviews Microbiology**, v. 0123456789, 2021.

BEUTLER, J. A.; ALVARADO, A. B.; SCHAUFELBERGER, D. E.; ANDREWS, P.; MCCLOUD, T. G. Dereplication of phorbol bioactives: *Lyngbya majuscula* and *Croton cuneatus*. **Journal of Natural Products**, v. 53, n. 4, p. 867–874, 1990.

BLAŽENOVIC, I.; KIND, T.; JI, J.; FIEHN, O. Software tools and approaches for compound identification of LC-MS/MS data in metabolomics. **Metabolites**, v. 8, n. 2,

2018.

BLUNT, J. W.; CARROLL, A. R.; COPP, B. R.; DAVIS, R. A.; KEYZERS, R. A.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 35, n. 1, p. 8–53, 2018.

BOLYEN, E.; RIDEOUT, J. R.; DILLON, M. R.; BOKULICH, N. A.; ABNET, C. C.; AL-GHALITH, G. A.; ALEXANDER, H.; ALM, E. J.; ARUMUGAM, M.; ASNICAR, F.; BAI, Y.; BISANZ, J. E.; BITTINGER, K.; BREJNROD, A.; BRISLAWN, C. J.; BROWN, C. T.; CALLAHAN, B. J.; CARABALLO-RODRÍGUEZ, A. M.; CHASE, J.; COPE, E. K.; DA SILVA, R.; DIENER, C.; DORRESTEIN, P. C.; DOUGLAS, G. M.; DURALL, D. M.; DUVALLET, C.; EDWARDSON, C. F.; ERNST, M.; ESTAKI, M.; FOUQUIER, J.; GAUGLITZ, J. M.; GIBBONS, S. M.; GIBSON, D. L.; GONZALEZ, A.; GORLICK, K.; GUO, J.; HILLMANN, B.; HOLMES, S.; HOLSTE, H.; HUTTENHOWER, C.; HUTTLEY, G. A.; JANSSEN, S.; JARMUSCH, A. K.; JIANG, L.; KAEHLER, B. D.; KANG, K. Bin; KEEFE, C. R.; KEIM, P.; KELLEY, S. T.; KNIGHTS, D.; KOESTER, I.; KOSCIOLEK, T.; KREPS, J.; LANGILLE, M. G. I.; LEE, J.; LEY, R.; LIU, Y. X.; LOFTFIELD, E.; LOZUPONE, C.; MAHER, M.; MAROTZ, C.; MARTIN, B. D.; MCDONALD, D.; MCIVER, L. J.; MELNIK, A. V.; METCALF, J. L.; MORGAN, S. C.; MORTON, J. T.; NAIMEY, A. T.; NAVAS-MOLINA, J. A.; NOTHIAS, L. F.; ORCHANIAN, S. B.; PEARSON, T.; PEOPLES, S. L.; PETRAS, D.; PREUSS, M. L.; PRUESSE, E.; RASMUSSEN, L. B.; RIVERS, A.; ROBESON, M. S.; ROSENTHAL, P.; SEGATA, N.; SHAFFER, M.; SHIFFER, A.; SINHA, R.; SONG, S. J.; SPEAR, J. R.; SWAFFORD, A. D.; THOMPSON, L. R.; TORRES, P. J.; TRINH, P.; TRIPATHI, A.; TURNBAUGH, P. J.; UL-HASAN, S.; VAN DER HOOFT, J. J. J.; VARGAS, F.; VÁZQUEZ-BAEZA, Y.; VOGTMANN, E.; VON HIPPEL, M.; WALTERS, W.; WAN, Y.; WANG, M.; WARREN, J.; WEBER, K. C.; WILLIAMSON, C. H. D.; WILLIS, A. D.; XU, Z. Z.; ZANEVELD, J. R.; ZHANG, Y.; ZHU, Q.; KNIGHT, R.; CAPORASO, J. G. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. **Nature Biotechnology**, v. 37, n. 8, p. 852–857, 2019.

BOUFRIDI, A.; QUINN, R. J. Turning metabolomics into drug discovery. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 8, p. 1334–1338, 2016.

BRAACK, L.; GOUVEIA DE ALMEIDA, A. P.; CORNEL, A. J.; SWANEPOEL, R.; DE JAGER, C. Mosquito-borne arboviruses of African origin: Review of key viruses and vectors. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, 2018.

BRUNETTI, A. E.; CARNEVALE NETO, F.; VERA, M. C.; TABOADA, C.; PAVARINI, D. P.; BAUERMEISTER, A.; LOPES, N. P. An integrative omics perspective for the analysis of chemical signals in ecological interactions. **Chemical Society Reviews**, v. 47, p. 1574–1591, 2018.

CAO, K. A. L.; COSTELLO, M. E.; LAKIS, V. A.; BARTOLO, F.; CHUA, X. Y.; BRAZEILLES, R.; RONDEAU, P. MixMC: A multivariate statistical framework to gain insight into microbial communities. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, 2016.

CHEN, C.; HU, J.; ZHANG, S.; ZHOU, P.; ZHAO, X.; XU, H.; ZHAO, X.; YASEEN, M.; LU, J. R. Molecular mechanisms of antibacterial and antitumor actions of designed surfactant-like peptides. **Biomaterials**, v. 33, n. 2, p. 592–603, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.09.059>>.

CHEN, W. C.; JUANG, R. S.; WEI, Y. H. Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. **Biochemical Engineering Journal**, v. 103, p. 158–169, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2015.07.009>>.

DA SILVA, G. N.; TRINDADE, F. T.; DOS SANTOS, F.; GOSMANN, G.; E SILVA, A. A.; GNOATTO, S. C. Larvicidal activity of natural and modified triterpenoids against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Pest management science**, v. 72, n. 10, p. 1883–1887, 2016.

DA SILVA, R. R.; WANG, M.; NOTHIAS, L. F.; VAN DER HOOFT, J. J. J.; CARABALLO-RODRÍGUEZ, A. M.; FOX, E.; BALUNAS, M. J.; KLASSEN, J. L.; LOPES, N. P.; DORRESTEIN, P. C. Propagating annotations of molecular networks using in silico fragmentation. **PLoS Computational Biology**, v. 14, n. 4, p. 1–26, 2018.

DE JESUS, J. G.; DUTRA, K. R.; SALES, F. C. da S.; CLARO, I. M.; TERZIAN, A. C.; CANDIDO, D. da S.; HILL, S. C.; THÉZÉ, J.; TORRES, C.; D'AGOSTINI, T. L.; FELIX, A. C.; NEGRI REIS, A. F.; ALCANTARA, L. C. J.; DE ABREU, A. L.; CRODA, J. H. R.; DE OLIVEIRA, W. K.; DE FILIPIIS, A. M. B.; CAMIS, M. D. C. R. D. S.; ROMANO, C. M.; LOMAN, N. J.; PYBUS, O. G.; SABINO, E. C.; NOGUEIRA, M. L.; FARIA, N. R. Genomic detection of a virus lineage replacement event of dengue virus serotype 2 in Brazil, 2019. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 115, n. 4, p. 2–7, 2020.

DE SOUSA, F. D. M.; GROSSI, S. M.; MONTEIRO, G. C.; DEMARQUE, D. P.; ESPINDOLA, L. S. Dereplication and isolation of larvicidal compounds from Annonaceae species against *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 30, n. 1, p. 123–126, 2020.

DEMARQUE, D. P.; CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: An important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. **Natural Product Reports**, v. 33, n. 3, p. 432–455, 2016.

DEMARQUE, D. P.; DUSI, R. G.; DE SOUSA, F. D. M.; GROSSI, S. M.; SILVÉRIO, M. R. S.; LOPES, N. P.; ESPINDOLA, L. S. Mass spectrometry-based metabolomics approach in the isolation of bioactive natural products. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–9, 2020.

DEMARQUE, D. P.; ESPINDOLA, L. S. Challenges, advances and opportunities in exploring natural products to control arboviral disease vectors. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, n. November, p. 1–10, 2021.

DUNCAN, K. R.; CRÜSEMANN, M.; LECHNER, A.; SARKAR, A.; LI, J.; ZIEMERT, N.; WANG, M.; BANDEIRA, N.; MOORE, B. S.; DORRESTEIN, P. C.; JENSEN, P. R. Molecular networking and pattern-based genome mining improves discovery of biosynthetic gene clusters and their products from *salinispora* species. **Chemistry and Biology**, v. 22, n. 4, p. 460–471, 2015.

ELSHAHAWI, S. I.; SHAABAN, K. A.; KHAREL, M. K.; THORSON, J. S. A comprehensive review of glycosylated bacterial natural products. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 21, p. 7591–7697, 2015.

ERNST, M.; KANG, K. Bin; CARABALLO-RODRÍGUEZ, A. M.; NOTHIAS, L. F.; WANDY, J.; CHEN, C.; WANG, M.; ROGERS, S.; MEDEMA, M. H.; DORRESTEIN, P. C.; VAN DER HOOFT, J. J. J. Molnetenhancer: Enhanced molecular networks by integrating metabolome mining and annotation tools. **Metabolites**, v. 9, n. 7, 2019.

ERNST, M.; SILVA, D. B.; SILVA, R. R.; VÊNICO, R. Z. N.; LOPES, N. P. Mass spectrometry in plant metabolomics strategies: from analytical platforms to data acquisition and processing. **Natural Product Reports**, v. 31, p. 784–806, 2014.

FADAKA, A. O.; SIBUYI, N. R. S.; MARTIN, D. R.; GOBOZA, M.; KLEIN, A.; MADIEHE, A. M.; MEYER, M. Immunoinformatics design of a novel epitope-based vaccine candidate against dengue virus. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–22, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-021-99227-7>>.

FAVARO, G.; BOGIALLI, S.; DI GANGI, I. M.; NIGRIS, S.; BALDAN, E.; SQUARTINI, A.; PASTORE, P.; BALDAN, B. Characterization of lipopeptides produced by *Bacillus licheniformis* using liquid chromatography with accurate tandem mass spectrometry. **Rapid communications in mass spectrometry : RCM**, v. 30, n. 20, p. 2237–2252, 2016.

FENN, J. B.; MANN, M.; MENG, C. K.; WONG, S. F. Electrospray ionization-principles and practice. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 9, p. 37–70, 1990.

FERREIRA, E. G.; TORRES, M. da C. M.; DA SILVA, A. B.; COLARES, L. L. F.; PIRES, K.; LOTUFO, T. M. C.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L.; COSTA-LOTUFO, L. V.; JIMENEZ, P. C. Prospecting anticancer compounds in actinomycetes recovered from the sediments of Saint Peter and Saint Paul's Archipelago, Brazil. **Chemistry and Biodiversity**, v. 13, n. 9, p. 1149–1157, 2016.

FEUNANG, Y. D.; EISNER, R.; KNOX, C.; CHEPELEV, L.; HASTINGS, J.; OWEN, G.; FAHY, E.; STEINBECK, C.; SUBRAMANIAN, S.; BOLTON, E.; GREINER, R.; WISHART, D. S. ClassyFire: automated chemical classification with a comprehensive, computable taxonomy. **Journal of Cheminformatics**, v. 8, n. 1, p. 1–20, 2016.

FIGHN, O.; ROBERTSON, D.; GRIFFIN, J.; VAN DER WERF, M.; NIKOLAU, B.; MORRISON, N.; SUMNER, L. W.; GOODACRE, R.; HARDY, N. W.; TAYLOR, C.; FOSTEL, J.; KRISTAL, B.; KADDURAH-DAOUK, R.; MENDES, P.; VAN OMMEN, B.; LINDON, J. C.; SANSONE, S. A. The metabolomics standards initiative (MSI). **Metabolomics**, v. 3, p. 175–178, 2007.

GAUDÊNCIO, S. P.; PEREIRA, F. Dereplication: Racing to speed up the natural products discovery process. **Natural Product Reports**, v. 32, n. 6, p. 779–810, 2015.

GERWICK, W. H.; MOORE, B. S. Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology. **Chemistry and Biology**, v. 19, n. 1, p. 85–98, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2011.12.014>>.

GUDIÑA, E. J.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Biosurfactants produced by marine microorganisms with therapeutic applications. **Marine Drugs**, v. 14, n. 2, 2016.

HU, Y.; CHEN, J.; HU, G.; YU, J.; ZHU, X.; LIN, Y.; CHEN, S.; YUAN, J. Statistical research on the bioactivity of new marine natural products discovered during the 28 years from 1985 to 2012. **Marine Drugs**, v. 13, n. 1, p. 202–221, 2015.

HUBERT, J.; NUZILLARD, J. M.; RENAULT, J. H. Dereplication strategies in natural product research: How many tools and methodologies behind the same concept? **Phytochemistry Reviews**, v. 16, n. 1, p. 55–95, 2017.

IÓCA, L. P.; ALLARD, P. M.; BERLINCK, R. G. S. Thinking big about small beings-the (yet) underdeveloped microbial natural products chemistry in Brazil. **Natural Product Reports**, v. 31, n. 5, p. 646–675, 2014.

JANEK, T.; KRASOWSKA, A.; RADWAŃSKA, A.; ŁUKASZEWICZ, M. Lipopeptide biosurfactant pseudofactin II induced apoptosis of melanoma A 375 cells by specific interaction with the plasma membrane. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. 1–9, 2013.

JIMENEZ, P. C.; WILKE, D. V.; FERREIRA, E. G.; TAKEARA, R.; DE MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LOTUFO, T. M. D. C.; LOPES, N. P.; COSTA-LOTUFO, L. V. Structure elucidation and anticancer activity of 7-oxostaurosporine derivatives from the Brazilian endemic tunicate *Eudistoma vannamei*. **Marine Drugs**, v. 10, n. 5, p. 1092–1102, 2012.

JIZBA, J.; SAMOUKINA, G. V.; IVANOVA-KOVACHEVA, T.; KANDYBIN, N. V. Insecticidal activity of pyrrolizine derivatives isolated from *Streptomyces griseus*. **Folia Microbiologica**, v. 37, n. 6, p. 461–462, 1992.

JOHNSON, A. R.; CARLSON, E. E. Collision-Induced Dissociation Mass Spectrometry: A Powerful Tool for Natural Product Structure Elucidation. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 21, p. 10668–10678, 2015.

KAPOOR, R.; SAINI, A.; SHARMA, D. Indispensable role of microbes in anticancer drugs and discovery trends. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 106, n. 13–16, p. 4885–4906, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00253-022-12046-2>>.

KATAJAMAA, M.; MIETTINEN, J.; OREŠIČ, M. MZmine: Toolbox for processing and visualization of mass spectrometry based molecular profile data. **Bioinformatics**, v. 22, n. 5, p. 634–636, 2006.

KHALIFA, S. A. M.; ELIAS, N.; FARAG, M. A.; CHEN, L.; SAEED, A.; HEGAZY, M. E. F.; MOUSTAFA, M. S.; EL-WAHED, A. A.; AL-MOUSAWI, S. M.; MUSHARRAF, S. G.; CHANG, F. R.; IWASAKI, A.; SUENAGA, K.; ALAJLANI, M.; GÖRANSSON, U.; EL-SEEDI, H. R. Marine natural products: A source of novel anticancer drugs. **Marine Drugs**, v. 17, n. 9, 2019.

KIM, S. H.; SHIN, Y. K.; SOHN, Y. C.; KWON, H. C. Two new cholic acid derivatives from the marine ascidian-associated bacterium *Halobacter halocynthiae*. **Molecules**, v. 17, n. 10, p. 12357–12364, 2012.

KÜGLER, J. H.; LE ROES-HILL, M.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Surfactants tailored by the class Actinobacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. MAR, 2015.

LIANG, X.; LUO, D.; LUESCH, H. Advances in exploring the therapeutic potential of marine natural products. **Pharmacological Research**, v. 147, n. April, p. 104373, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104373>>.

MANEERAT, S.; NITODA, T.; KANZAKI, H.; KAWAI, F. Bile acids are new products of a marine bacterium, *Myroides* sp. strain SM1. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 679–683, 2005.

MATULJA, D.; WITTINE, K.; MALATESTI, N.; LACLEF, S.; TURKS, M.; MARKOVIC, M. K.; AMBROŽIĆ, G.; MARKOVIĆ, D. Marine natural products with high anticancer activities. **Current Medicinal Chemistry**, v. 27, n. 8, p. 1243–1307, 2020.

MELNIK, A. V.; DA SILVA, R. R.; HYDE, E. R.; AKSENOV, A. A.; VARGAS, F.; BOUSLIMANI, A.; PROTSYUK, I.; JARMUSCH, A. K.; TRIPATHI, A.; ALEXANDROV, T.; KNIGHT, R.; DORRESTEIN, P. C. Coupling targeted and untargeted mass spectrometry for metabolome-microbiome-wide association studies of human fecal samples. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 14, p. 7549–7559, 2017.

MINCER, T. J.; JENSEN, P. R.; KAUFFMAN, C. A.; FENICAL, W. Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 10, p. 5005–5011, 2002.

MOHIMANI, H.; GUREVICH, A.; MIKHEENKO, A.; GARG, N.; NOTHIAS, L. F.; NINOMIYA, A.; TAKADA, K.; DORRESTEIN, P. C.; PEVZNER, P. A. Dereplication of peptidic natural products through database search of mass spectra. **Nature Chemical Biology**, v. 13, n. 1, p. 30–37, 2017.

NAHAR, L.; SARKER, S. D. A review on steroid dimers: 2011–2019. **Steroids**, v. 164, n. September, p. 108736, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.steroids.2020.108736>>.

NAHAR, L.; SARKER, S.; TURNER, A. A review on synthetic and natural steroid dimers: 1997-2006. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 1349–1370, 2007.

NAINE, S. J.; DEVI, C. S. Larvicidal and repellent properties of *Streptomyces* sp. VITJS4 crude extract against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Polish Journal of Microbiology**, v. 63, n. 3, p. 341–348, 2014.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.

NOTHIAS, L. F.; PETRAS, D.; SCHMID, R.; DÜHRKOP, K.; RAINER, J.; SARVEPALLI, A.; PROTSYUK, I.; ERNST, M.; TSUGAWA, H.; FLEISCHAUER, M.; AICHELER, F.; AKSENOV, A. A.; ALKA, O.; ALLARD, P. M.; BARSCH, A.; CACHET, X.; CARABALLO-RODRIGUEZ, A. M.; DA SILVA, R. R.; DANG, T.; GARG, N.; GAUGLITZ, J. M.; GUREVICH, A.; ISAAC, G.; JARMUSCH, A. K.; KAMENÍK, Z.; KANG, K. Bin; KESSLER, N.; KOESTER, I.; KORF, A.; LE GOUELLEC, A.; LUDWIG, M.; MARTIN H, C.; MCCALL, L. I.; MCSAYLES, J.; MEYER, S. W.; MOHIMANI, H.; MORSY, M.; MOYNE, O.; NEUMANN, S.; NEUWEGER, H.; NGUYEN, N. H.; NOTHIAS-ESPOSITO, M.; PAOLINI, J.; PHELAN, V. V.; PLUSKAL, T.; QUINN, R. A.;

ROGERS, S.; SHRESTHA, B.; TRIPATHI, A.; VAN DER HOOFT, J. J. J.; VARGAS, F.; WELDON, K. C.; WITTING, M.; YANG, H.; ZHANG, Z.; ZUBEIL, F.; KOHLBACHER, O.; BÖCKER, S.; ALEXANDROV, T.; BANDEIRA, N.; WANG, M.; DORRESTEIN, P. C. Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment. **Nature Methods**, v. 17, n. 9, p. 905–908, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41592-020-0933-6>>.

OLIVON, F.; GRELIER, G.; ROUSSI, F.; LITAUDON, M.; TOUBOUL, D. MZmine 2 data-preprocessing to enhance molecular networking reliability. **Analytical chemistry**, v. 89, p. 7836–7840, 2017.

ŌMURA, S.; ASAMI, Y.; CRUMP, A. Staurosporine: new lease of life for parent compound of today's novel and highly successful anti-cancer drugs. **Journal of Antibiotics**, v. 71, n. 8, p. 688–701, 2018.

PAUL, A.; HARRINGTON, P. de B. Chemometric applications in metabolomic studies using chromatography-mass spectrometry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 135, p. 116165, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116165>>.

PIEL, J. Metabolites from symbiotic bacteria. **Natural Product Reports**, v. 26, n. 3, p. 338–362, 2009.

PLUSKAL, T.; CASTILLO, S.; VILLAR-BRIONES, A.; OREŠIČ, M. MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. **BMC Bioinformatics**, v. 11, 2010.

PURVES, K.; MACINTYRE, L.; BRENNAN, D.; HREGGVIÐSSON, G.; KUTTNER, E.; ÁSGEIRSDÓTTIR, M. E.; YOUNG, L. C.; GREEN, D. H.; EDRADA-EBEL, R.; DUNCAN, K. R. Using molecular networking for microbial secondary metabolite bioprospecting. **Metabolites**, v. 6, n. 1, 2016.

QIAO, X.; YE, M.; LIU, C. F.; YANG, W. Z.; MIAO, W. J.; DONG, J.; GUO, D. A. A tandem mass spectrometric study of bile acids: Interpretation of fragmentation pathways and differentiation of steroid isomers. **Steroids**, v. 77, n. 3, p. 204–211, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2011.11.008>>.

QIN, L. Le; ZHOU, B.; DING, W.; MA, Z. Bioactive metabolites from marine-derived *Streptomyces* sp. A68 and its Rifampicin resistant mutant strain R-M1. **Phytochemistry Letters**, v. 23, n. October 2017, p. 46–51, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.phytol.2017.11.002>>.

SALVADOR-NETO, O.; GOMES, S. A.; SOARES, A. R.; DA SILVA MACHADO, F. L.; SAMUELS, R. I.; FONSECA, R. N. Da; SOUZA-MENEZES, J.; DA CUNHA MORAES, J. L.; CAMPOS, E.; MURY, F. B.; SILVA, J. R. Larvicidal potential of the halogenated sesquiterpene (+)-obtusol, isolated from the alga *Laurencia dendroidea* J. Agardh (Ceramiales: Rhodomelaceae), against the dengue vector mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae). **Marine Drugs**, v. 14, n. 2, 2016.

SATPUTE, S. K.; BANAT, I. M.; DHAKEPHALKAR, P. K.; BANPURKAR, A. G.; CHOPADE, B. A. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 4, p. 436–450, 2010. Disponível

em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.02.006>>.

SILVA, R. L.; MELLO, T. R. B.; SOUSA, J. P. B.; ALBERNAZ, L. C.; MAGALHÃES, N. M. G.; MORAIS, L. S.; FRANCISCO, L. R.; LEAL, W. S.; ESPINDOLA, L. S. Brazilian Cerrado biome essential oils to control the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **Industrial Crops and Products**, v. 178, n. October 2021, p. 114568, 2022.

SILVÉRIO, M. R. S.; ESPINDOLA, L. S.; LOPES, N. P.; VIEIRA, P. C. Plant natural products for the control of *Aedes aegypti*: The main vector of important arboviruses. **Molecules**, v. 25, n. 15, 2020.

SONG, C.; YANG, J.; ZHANG, M.; DING, G.; JIA, C.; QIN, J.; GUO, L. Marine natural products: the important resource of biological insecticide. **Chemistry and Biodiversity**, v. 18, n. 5, 2021.

SUBRAMANI, R.; AALBERSBERG, W. Marine actinomycetes: An ongoing source of novel bioactive metabolites. **Microbiological Research**, v. 167, n. 10, p. 571–580, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2012.06.005>>.

SUMNER, L. W.; AMBERG, A.; BARRETT, D.; BEALE, M. H.; BEGER, R.; DAYKIN, C. A.; FAN, T. W. M.; FIEHN, O.; GOODACRE, R.; GRIFFIN, J. L.; HANKEMEIER, T.; HARDY, N.; HARNLY, J.; HIGASHI, R.; KOPKA, J.; LANE, A. N.; LINDON, J. C.; MARRIOTT, P.; NICHOLLS, A. W.; REILY, M. D.; THADEN, J. J.; VIANT, M. R. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis: Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). **Metabolomics**, v. 3, n. 3, p. 211–221, 2007.

TORRES-MENDOZA, D.; CORONADO, L. M.; PINEDA, L. M.; GUZMÁN, H. M.; DORRESTEIN, P. C.; SPADAFORA, C.; GUTIÉRREZ, M. Pumilacidins from the octocoral-associated *Bacillus* sp. Dt001 display anti-proliferative effects in *Plasmodium falciparum*. **Molecules**, v. 23, n. 9, 2018.

VÁZQUEZ-BAEZA, Y.; PIRRUNG, M.; GONZALEZ, A.; KNIGHT, R. EMPEROR: A tool for visualizing high-throughput microbial community data. **GigaScience**, v. 2, n. 1, p. 2–5, 2013.

VÉKEY, K. Mass spectrometry and mass-selective detection in Chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 10, n. 921, p. 227–236, 2001. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2291582&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

VELASCO-ALZATE, K. Y.; BAUERMEISTER, A.; TANGERINA, M. M. P.; LOTUFO, T. M. C.; FERREIRA, M. J. P.; JIMENEZ, P. C.; PADILLA, G.; LOPES, N. P.; COSTA-LOTUFO, L. V. Marine Bacteria from Rocas Atoll as a rich source of pharmacologically active compounds. **Marine Drugs**, v. 17, n. 12, p. 1–16, 2019.

VIANT, M. R.; KURLAND, I. J.; JONES, M. R.; DUNN, W. B. How close are we to complete annotation of metabolomes? **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 36, p. 64–69, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.01.001>>.

WANG, M.; CARVER, J. J.; PHELAN, V. V.; SANCHEZ, L. M.; GARG, N.; PENG, Y.; NGUYEN, D. D.; WATROUS, J.; KAPONO, C. A.; LUZZATTO-KNAAN, T.; PORTO, C.; BOUSLIMANI, A.; MELNIK, A. V.; MEEHAN, M. J.; LIU, W. T.; CRÜSEMANN, M.; BOUDREAU, P. D.; ESQUENAZI, E.; SANDOVAL-CALDERÓN, M.; KERSTEN, R. D.; PACE, L. A.; QUINN, R. A.; DUNCAN, K. R.; HSU, C. C.; FLOROS, D. J.; GAVILAN, R. G.; KLEIGREWE, K.; NORTHEN, T.; DUTTON, R. J.; PARROT, D.; CARLSON, E. E.; AIGLE, B.; MICHELSEN, C. F.; JELSBAK, L.; SOHLENKAMP, C.; PEVZNER, P.; EDLUND, A.; MCLEAN, J.; PIEL, J.; MURPHY, B. T.; GERWICK, L.; LIAW, C. C.; YANG, Y. L.; HUMPF, H. U.; MAANSSON, M.; KEYZERS, R. A.; SIMS, A. C.; JOHNSON, A. R.; SIDEBOTTOM, A. M.; SEDIO, B. E.; KLITGAARD, A.; LARSON, C. B.; BOYA, C. A. P.; TORRES-MENDOZA, D.; GONZALEZ, D. J.; SILVA, D. B.; MARQUES, L. M.; DEMARQUE, D. P.; POCIUTE, E.; O'NEILL, E. C.; BRIAND, E.; HELFRICH, E. J. N.; GRANATOSKY, E. A.; GLUKHOV, E.; RYFFEL, F.; HOUSON, H.; MOHIMANI, H.; KHARBUSH, J. J.; ZENG, Y.; VORHOLT, J. A.; KURITA, K. L.; CHARUSANTI, P.; MCPHAIL, K. L.; NIELSEN, K. F.; VUONG, L.; ELFEKI, M.; TRAXLER, M. F.; ENGENE, N.; KOYAMA, N.; VINING, O. B.; BARIC, R.; SILVA, R. R.; MASCUCH, S. J.; TOMASI, S.; JENKINS, S.; MACHERLA, V.; HOFFMAN, T.; AGARWAL, V.; WILLIAMS, P. G.; DAI, J.; NEUPANE, R.; GURR, J.; RODRÍGUEZ, A. M. C.; LAMSA, A.; ZHANG, C.; DORRESTEIN, K.; DUGGAN, B. M.; ALMALITI, J.; ALLARD, P. M.; PHAPALE, P.; NOTHIAS, L. F.; ALEXANDROV, T.; LITAUDON, M.; WOLFENDER, J. L.; KYLE, J. E.; METZ, T. O.; PERYEA, T.; NGUYEN, D. T.; VANLEER, D.; SHINN, P.; JADHAV, A.; MÜLLER, R.; WATERS, K. M.; SHI, W.; LIU, X.; ZHANG, L.; KNIGHT, R.; JENSEN, P. R.; PALSSON, B.; POGLIANO, K.; LININGTON, R. G.; GUTIÉRREZ, M.; LOPES, N. P.; GERWICK, W. H.; MOORE, B. S.; DORRESTEIN, P. C.; BANDEIRA, N. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 828–837, 2016.

WEINZIERL, R.; HENN, T.; KOEHLER, P. G.; TUCKER, C. L. Microbial Insecticides. **Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida**, n. ENY275, p. 1–13, 2005. Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu>>.

WOLFENDER, J. L. HPLC in natural product analysis: The detection issue. **Planta Medica**, v. 75, n. 7, p. 719–734, 2009.

YANG, J. Y.; SANCHEZ, L. M.; RATH, C. M.; LIU, X.; BOUDREAU, P. D.; BRUNS, N.; GLUKHOV, E.; WODTKE, A.; DE FELICIO, R.; FENNER, A.; WONG, W. R.; LININGTON, R. G.; ZHANG, L.; DEBONSI, H. M.; GERWICK, W. H.; DORRESTEIN, P. C. Molecular networking as a dereplication strategy. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 9, p. 1686–1699, 2013.

YI, L.; DONG, N.; YUN, Y.; DENG, B.; REN, D.; LIU, S.; LIANG, Y. Chemometric methods in data processing of mass spectrometry-based metabolomics: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 914, p. 17–34, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2016.02.001>>.

