



**Sara Margarida Filipe Pereira**

Licenciatura em Biologia

**Pesquisa de novos metabolitos secundários bioactivos  
em bactérias de sedimentos marinhos**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Genética Molecular e Biomedicina

Orientadora: Doutora Susana Gaudêncio  
Investigadora Auxiliar, REQUIMTE/CQFB

Co-orientadora: Prof. Doutora Ilda Sanches  
Prof. Associada, CREM/FCT-UNL

Co-orientadora: Prof. Doutora Ana M. Lobo  
Prof. Decana, REQUIMTE/CQFB

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Ana Paula Gonçalves

Arguente: Prof. Doutor João Almeida

Vogal: Prof. Doutora Ilda Sanches

Novembro, 2012

Copyright Sara Margarida Filipe Pereira, FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

## **Agradecimentos:**

Aos meus pais que sempre me deram asas para voar. Obrigada por todo o amor e carinho.

À Doutora Susana Gaudêncio que me recebeu de braços abertos sem nunca me ter conhecido, pela confiança depositada e pela oportunidade que me deu de entrar no mundo dos actinomicetos. Permitiu-me cometer os meus erros e da mesma forma resolve-los.

À Prof. Dra. Ana Lobo, pelo apoio e pelo entusiasmo com cada pequeno resultado obtido, por ter partilhado ideias e hipóteses.

À Prof. Dra. Ilda Sanches pelo auxílio nos ensaios biológicos e por todos ensinamentos que me passou.

Agradeço também aos investigadores Paul Jensen e Chris Kauffman do Scripps Institution of Oceanography UC, San Diego que tive oportunidade de conhecer. Assim tudo é fácil e não há impossíveis.

À Prof. Dra. Cecília M. Rodrigues do Centro de Patogénese Molecular da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa pela realização dos ensaios anticancerígenos (HCT-116).

Agradeço a toda a equipa da Estrutura de Missão para os Assuntos do Mar (EMAM) com a qual colaborei e possibilitou a recolha de parte das amostras tratadas.

À Prof. Doutora Rosario Mato pela cedência da estirpe VRE EF-82. À Doutora Sandra Aguiar (ICAT, FCUL) pela ajuda na análise filogenética.

Ao meu colega e amigo de trabalhos Viriato M'Bana. Tanto em terra como no mar, por toda a ajuda nas horas mais difíceis. Obrigada pela tua dedicação e não mais importante, pela tua calma que no meu mundo às vezes parece não existir.

À Raquel Seabra, com quem passei muitas horas no laboratório, pelos conselhos úteis, e pela transmissão de conhecimentos sempre que iniciava uma nova etapa neste trabalho, essencial para o bom desenvolvimento desta tese.

Ao Dr. Christophe Rocca pelo shaker emprestado que nos poupou imenso tempo.

Às técnicas Nicole Soares e Tânia Pereira por toda a ajuda na preparação do material e palavras de apoio.

Por último, não menos importante ao João Correia pelo apoio e companhia quando as horas não chegam para tudo, pelos só 10 min. no lab. 333 e especialmente por já ires sabendo do que preciso.

A todos aqueles que de alguma forma me apoiaram ao longo deste ano e contribuíram para que esta tese chegasse a bom porto.

Este trabalho foi integrado nos projectos financiados pela Fundação para a Ciência e Tecnologia Portugal com co-financiamento do FEDER: PTDC/QUI-QUI/101813/2008 Marinat Prod-XXI (Investigadora Responsável: Ana Lobo e PTDC/QUI-QUI/119116/2011 Tesouros Oceânicos (Inv. Responsável Susana Gaudêncio). O financiamento para a colheita de amostras no Arquipélago da Madeira foi obtido através do 7 Programa Quadro da União Europeia (FP7/2007-2013) sob o acordo n°PCOFUND-GA-2009-246542 e da Fundação para a Ciência e a Tecnologia Portugal.

## **Divulgação de parte dos resultados da tese**

Comunicações em poster:

S. P. Gaudêncio, S. M. Pereira, V. M'Bana, P. M. Borralho, C. M. Rodrigues, I. Santos Sanches, P. R. Jensen, W. Fenical and A. M. Lobo "Marine Bacteria as a Novel Resource for Drug Discovery", Marie Curie Actions Congress, June 10-15th, 2012, Dublin, Ireland.

S. P. Gaudêncio, S. M. Pereira, V. M'Bana, P. M. Borralho, S. E. Gomes, C. M. Rodrigues, I. Santos Sanches, P. R. Jensen and A. M. Lobo "Marine Bacteria: Anticancer and Antibiotic Activity Novel Source for Drug Discovery", 6th Spanish Portuguese Japanese Organic Chemistry Symposium/6SPJOCS - SPQ, June 18-20th, 2012, Lisbon, Portugal.

## Resumo:

O principal objectivo deste trabalho foi explorar o potencial biotecnológico sobre o ponto de vista microbiológico, de compostos químicos produzidos por bactérias marinhas presentes em sedimentos marinhos da plataforma continental portuguesa.

Um total de 67 amostras de sedimentos marinhos recolhidos nos arquipélagos dos Açores, Madeira e da região de Sesimbra foram processados de forma a estudar o seu potencial biotecnológico a nível de actividade antimicrobiana e citotóxica. Destes sedimentos marinhos, isolaram-se 12 estirpes bacterianas produtoras de compostos com actividade antibacteriana contra estirpes bacterianas de Gram positivo *Staphylococcus aureus* resistente à metilina e *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina, e cinco com actividade citotóxica para linhas celulares do carcinoma do cólon humano HTC-116. Os valores de MIC e IC50 foram calculados para os respectivos extractos químicos.

Este trabalho permitiu também fazer um estudo de biodiversidade biológica através da sequenciação do gene 16S rDNA. Foram identificados oito géneros diferentes, sendo o género *Streptomyces* o mais comum.

**Palavras-chave:** Actinomicetos, actividade antimicrobiana, actividade citotóxica, biodiversidade Oceano Atlântico.



**Abstract:**

The main of this study was to explore the potential of the resources on a microbiological point of view, of the chemical compounds produced by marine bacteria present in marine sediments from the Portuguese continental shelf. A total of 67 marine sediment samples were collected from offshore of Azores and Madeira archipelago and also from the Sesimbra coastline. The strains isolated from the processed sediment samples were tested for their antimicrobial and cytotoxic activity. Of these strains, 12 showed activity against Gram positive *Staphylococcus aureus* methicillin resistant and vancomycin resistant Enterococcus faecalis vancomycin resistant, and 5 showed cytotoxicity against HTC-116 cancer cell lines. Minimum inhibitory concentration and IC50 was calculated for each sample.

The 16S rDNA gene sequencing research allowed to accomplish a study over the biodiversity distribution in these areas. Eight different genus were identified however, *Streptomyces* was the most common.

**Key-words:** Actinomycetes, antimicrobial activity, cytotoxicity, biodiversity, Atlantic Ocean.

## Índice Remissivo

A1 – Meio de cultura rico em nutrientes

A1 BFe+C – Meio de cultura rico em ferro

A1DI – Meio de cultura sem água do mar

AZ – Açores

BHI – Meio de cultura com nutrientes de cérebro e coração de gado

CFU – Unidades formadoras de colónias

DMSO – Dimetilsulfóxido

D. O. – Densidade óptica

FC – Funchal

FG – Formigas

HTC-116 – Linha celular de carcinoma humano

IC50 – Concentração necessária para inibir 50% da actividade da bacteriana

MIC – Concentração mínima inibitória

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

MTT – Ensaio de avaliação da viabilidade celular

PCR – Reacção em cadeia da polimerase

PS – Porto Santo

SM – Sta Maria

SS – Sesimbra

SWA – Meio de cultura pobre em nutrientes

VRE – *Enterococcus* resistente à vancomicina

# Índice

1	Introdução.....	1
1.1	Bactérias em meio marinho .....	1
1.2	Estudos desenvolvidos - Classe Actinobacteria.....	2
1.2.1	Género <i>Salinospora</i> .....	3
2	Materiais e Métodos .....	6
2.1	Recolha de sedimentos marinhos .....	6
2.2	Isolamento de bactérias dos sedimentos marinhos .....	7
2.3	Extracção de extratos ou crudes .....	8
2.4	Determinação da actividade antimicrobiana dos extractos ou crudes .....	9
2.4.1	Patogénicos utilizados nos testes biológicos.....	9
2.4.2	Avaliação da Concentração Mínima Inibitória (MIC).....	9
2.4.3	Avaliação do efeito bacteriolítico ou bacteriostático dos extractos químicos.....	11
2.5	Ensaio citotóxicos .....	11
2.6	Isolamento de DNA bacteriano para PCR.....	11
2.7	Amplificação do 16S rRNA pela técnica de PCR .....	12
2.8	Purificação de produtos de PCR .....	13
2.9	Sequenciação do 16S rDNA.....	14
2.10	Análise Filogenética.....	14
2.11	Materiais .....	15
3	Resultados.....	18
3.1	Propagação de culturas bacterianas .....	18
3.2	Extractos químicos obtidos.....	19
3.3	Ensaio citotóxicos .....	19
3.4	Actividade antimicrobiana.....	20
3.5	Análise Filogenética.....	21
4	Discussão .....	26
5	Bibliografia.....	28



# 1 Introdução

## 1.1 Bactérias em meio marinho

Os sedimentos oceânicos cobrem a maior parte da superfície do Planeta constituindo principal recurso para a descoberta de novos produtos naturais com aplicações na indústria farmacêutica. Muitos habitats marinhos continuam por explorar o que revela ser um tesouro de oportunidades para exploração do potencial de recursos naturais existentes e obter novos produtos naturais marinhos bioactivos, com vista a descoberta de fármacos anticancerígenos e antibióticos. Este objectivo pode ser conseguido através do estudo de bactérias marinhas, sobre as quais pouco sabemos. As bactérias marinhas para assegurarem a sua sobrevivência em ambientes extremos desenvolveram capacidades metabólicas e fisiológicas especializadas. Estas capacidades oferecem potencial para a produção de metabolitos inexistentes em ambiente terrestre (Fenical,1993 e Prieto-Davó,2008). Ao mesmo tempo, as propriedades do meio marinho (pressão, salinidade ou temperatura) propiciam condições de produção de novos metabolitos (Jensen e Fenical, 1996).

A taxa de descoberta de novos compostos nos últimos anos abrandou, incitando a procura de fontes alternativas de diversidade química (Kwon, *et al.*, 2005). Dada a riqueza em nichos ecológicos inexplorados, o meio marinho tornou-se a fonte de procura de novos produtos naturais. As relações de simbiose entre bactérias e invertebrados, exclusivas deste meio, sejam de forma obrigatória ou casual proporcionam também a produção de novos metabolitos secundários que não será possível encontrar em meio terrestre (Jensen e Fenical, 1996). O interesse nas relações interespecíficas cresceu, já que bactérias poderão ser as verdadeiras geradoras dos produtos de defesa de invertebrados tais como esponjas e ascídias (Fenical, 1993) e sem dúvida despertam o interesse da indústria farmacêutica.

As similaridades taxonómicas existentes entre espécies de bactérias marinhas e as terrestres sugerem uma partilha de vários processos metabólicos, incluindo os biossintéticos, pelo que o estudo da taxonomia bacteriana será um marco para descoberta de novos produtos naturais (Jensen e Fenical, 1994). Utilizando novos métodos de selecção de organismos com potencial de produção de novos compostos restringe o estudo de metabolitos já descritos (Bull, 1992). A descoberta e o isolamento de novos compostos produzidos por bactérias marinhas têm sido estimulado pela indústria farmacêutica e cosmética, em busca de novas entidades químicas para desenvolvimento de princípios activos.

## 1.2 Estudos desenvolvidos - Classe Actinobacteria

A ciência tem sugerido estratégias para combater inúmeras patologias humanas. Actualmente, cerca de 120 drogas comercializadas têm origem num grupo de bactérias que são consideradas como as principais produtoras de antibióticos comercializados (Chalis, e Hopwood, 2003). O grupo de bactérias que se destaca dos 53 Filos existentes pertence à classe Actinobacteria (Stackebrandt *et al.*,1997) onde se encontram os géneros *Micromonospora*, *Rhodococcus* e *Streptomyces*. O ponto de viragem para o interesse pelas actinobactérias aconteceu em 1943 (Chalis, e Hopwood, 2003, Riedlinger, 2004), com o isolamento da estreptomomicina, o primeiro composto para tratar a tuberculose, em metabolito produzido pelo género *Streptomices*. A partir daí, um vasto leque de terapias recorrendo a compostos isolados de actinomicetos (ver tabela 1) tem sido desenvolvido (Jensen e Fenical, 2007).

**Tabela 1.1** Metabolitos produzidos por actinomicetos e suas aplicações no período de 2003-2005 (Adaptado de Lam, 2006)

Novel metabolites produced by marine actinomycetes during the period 2003–2005		
Compound	Source	Activity
Abyssomicins	<i>Verrucosispora</i> sp.	Antibacterial
Aureoverticillactam	<i>Streptomyces aureoverticillatus</i>	Anticancer
Bonactin	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial; antifungal
Caprolactones	<i>Streptomyces</i> sp.	Anticancer
Chandrananimycins	<i>Actinomadura</i> sp.	Antialagl; antibacterial; anticancer; antifungal
Chinikomycins	<i>Streptomyces</i> sp.	Anticancer
Chloro-dihydroquinones	<i>Novel actinomycete</i>	Antibacterial; anticancer
Diazepinomicin (ECO-4601)	<i>Micromonosproa</i> sp.	Antibacterial; anticancer; anti-inflammatory
3,6-disubstituted indoles	<i>Streptomyces</i> sp.	Anticancer
Frigocyclinone	<i>Streptomyces griseus</i>	Antibacterial
Glaciapyrroles	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial
Gutingimycin	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial
Helquinoline	<i>Janibacter limosus</i>	Antibacterial
Himalomycins	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial
IB-00208	<i>Actinomadura</i> sp.	Anticancer
Komodoquinone A	<i>Streptomyces</i> sp.	Neuritogenic activity
Lajollamycin	<i>Streptomyces nodosus</i>	Antibacterial
Marinomycins	' <i>Marinispora</i> '	Antibacterial; anticancer
Mechercharmucins	<i>Thermoactinomyces</i> sp.	Anticancer
MKN-349A	<i>Nocardiopsis</i> sp.	Unknown biological activity
Salinosporamide A (NPI-0052)	<i>Salinispora tropica</i>	Anticancer
Sporolides	<i>Salinispora tropica</i>	Unknown biological activity
Trioxacarcins	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial; anticancer; antimalarial

A actinomicina D é o metabolito mais antigo utilizado em tratamentos anticancerígenos, e o seu homólogo actinomicina A, foi o primeiro antibiótico isolado a partir de actinomicetos (Demain, 2009). No ano de 2011, diversos compostos isolados foram testados em ensaios clínicos anticancerígenos e duas novas drogas Yondelis® e Havelen® estão actualmente no mercado para tratamentos anticancerígenos. A amosamida A e B, dois compostos já isolados e produzidos pelo género *Streptomices*, revelaram, *in vitro* ter um potente efeito citotóxico contra

linhas celulares HCT-116 (Hughes, 2009). Ambos os compostos estão na fase de ensaios pré-clínicos para comercialização.

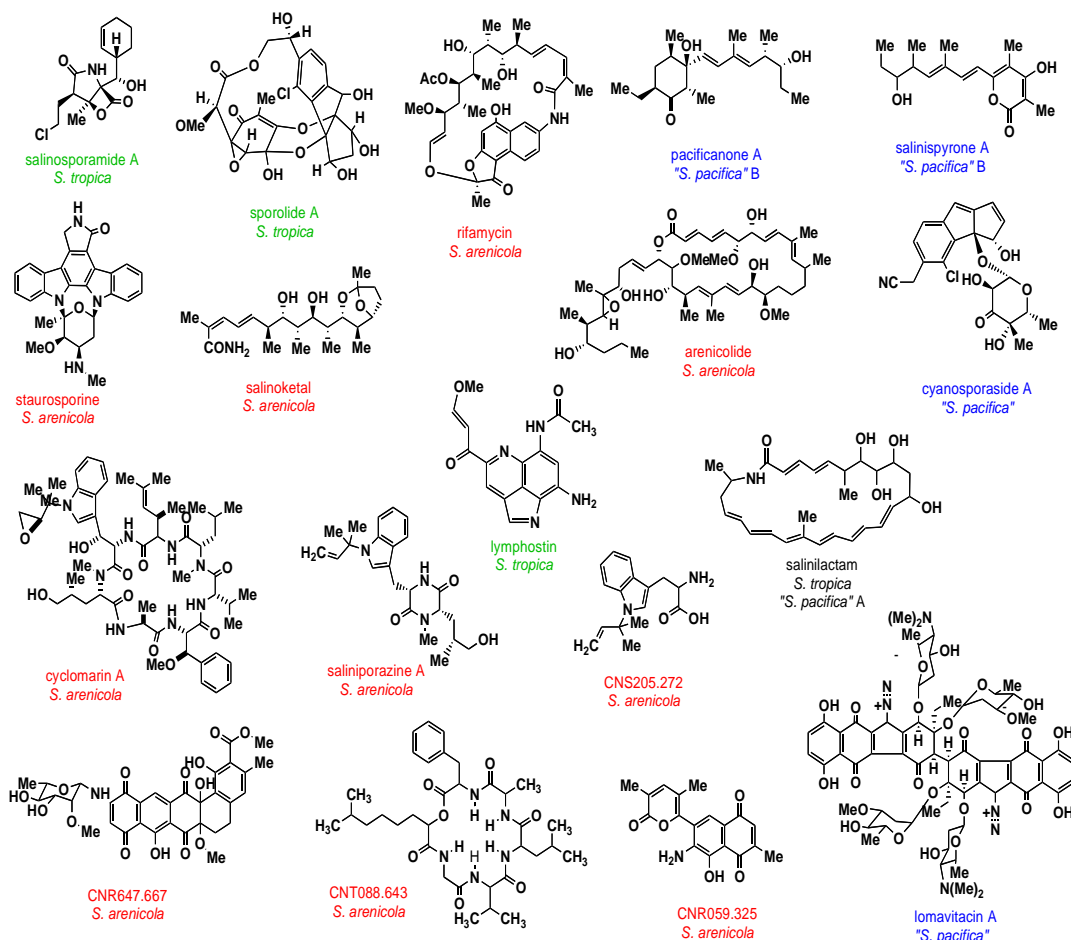
Apesar da uma grande variedade morfológica as actinobactérias terrestres e marinhas têm um padrão de crescimento comum, apresentando um filamento e produção de esporos que aparecem na superfície da colónia (Bull, 1992).

As propriedades demonstradas pelos compostos isolados de actinomicetos terrestres mostram que os estudos com actinomicetos marinhos é uma aposta ganha. Os metabolitos secundários produzidos por estes últimos, são estruturalmente diversos quando comparados com os dos terrestres (Buchanan *et. al.*, 2003) o que aumenta a probabilidade de produção de novos fármacos. Nos últimos anos, a preocupação com o aumento de bactérias multirresistentes a antibióticos tem sido crescente. No entanto, o composto marinopirrole A produzido por *Streptomyces* marinhos mostrou ter actividade antibiótica contra as estirpes MRSA, VRE e OHRSA (Hughes, 2008; Waness 2010) o que mostra que parte do combate a esta resistência parece estar dependente dos actinomicetos marinhos. Estes exemplos comprovam o real valor do estudo de metabolitos secundários produzidos por actinomicetos marinhos.

A origem destes microorganismos não é assunto de consenso entre os investigadores. Sabe-se que os actinomicetos terrestres produzem esporos que podem ser arrastados até ao mar mantendo-se viáveis e daí se sugerir que os actinomicetos marinhos são mero resultado de uma contaminação terrestre (Stackebrandt e Schleifer, 1984). Para além dos géneros relatados acima, estudos taxonómicos conduziram à descrição outros três novos géneros exclusivamente marinhos: *Salinibacterium*, *Serinicoccus* e *Salinospora* e a proposta de um quarto género denominado *Solwaraspora* (Prieto-Davó, 2008). O género *Salinospora* mereceu especial atenção neste trabalho.

### **1.2.1 Género *Salinospora***

A descoberta do género *Salinospora* (Jensen, 1991) foi um marco bastante importante para despoletar a probabilidade de novos compostos serem isolados e para a filogenia bacteriana. Este grupo distancia-se de todos os outros pois é o primeiro género descrito a necessitar obrigatoriamente de água salgada para o seu crescimento (Mincer, 2002). São altamente prolíficos quanto à produção de metabolitos secundários (ver figura 1.1), e são os microorganismos responsáveis pela produção de salinosporamida A (Feling, *et. al.*, 2003). Este composto é um inibidor do proteossoma, que foi isolado da espécie *Salinospora tropica*, e está actualmente está em fase I de ensaios clínicos anticancerígenos (Fenical *et. al.*, 2009).



**Figura 1.1** Diversidade de moléculas descobertas em estirpes pertencentes ao género *Salinospora*. As cores diferenciam as espécies de onde foram isolados. A preto estão os compostos isolados em mais que uma espécie (Adaptado de Jensen *et al.*, 2005b)

Para além da função inibitória, o composto salinosporamida A mostra-se eficaz em tratamentos hematológicos e antitumorais, sendo menos citotóxico para células ditas saudáveis. Possui um elevado grau de selectividade tumoral ( $IC_{50} < 10$  ng/mL) e por estas razões é um promissor composto na área dos tratamentos anticancerígenos. Este género apresenta uma ampla distribuição pelas regiões tropicais, não tendo ainda sido descrito nas regiões de maior latitude (Jensen, *et. al.*, 2005 e Freil, *et. al.*, 2011).

Assim, objectivo geral deste trabalho foi avaliar o potencial biológico dos recursos naturais portugueses através do estudo de sedimentos marinhos recolhidos nas regiões autónomas dos Açores e Madeira e na zona costeira de Sesimbra. Como objectivos específicos pretendeu-se testar a actividade citotóxica e anticancerígenas dos extractos químicos obtidos da cultura de actinomicetos isolados, e paralelamente fazer estudo sobre a biodiversidade bacteriana nestas regiões, nomeadamente sobre a presença do género *Salinospora*.



## 2 Materiais e Métodos

### 2.1 Recolha de sedimentos marinhos

A recolha de sedimentos marinhos (ou amostras de areia) ocorreu no arquipélago da Madeira (recolha integrada no projecto “Tesouros Oceânicos - Sedimentos oceânicos do Arquipélago da Madeira: nova fonte de compostos inovativos e bioactivos”, Ref. PTDC/ QUI-QUI/ 119116/ 2010. Investigadora Principal, Doutora Susana Gaudêncio). Deste local geográfico realizar uma colheita de 662 amostras de sedimento marinho, por colaboradores do projecto referido, entre 4 e 17 de Junho de 2012, através de mergulho em escafandro autónomo e para a recolha de amostras a grandes profundidades foi utilizado um colectador de lamas associado a uma roldana eléctrica. Entre cada mergulho foram recolhidas entre 40 a 50 amostras. Das 662 amostras, 42 foram recolhidas a profundidades entre os 129m e 1310m.

A recolha de sedimentos marinhos ocorreu também no arquipélago dos Açores de 1 a 12 de Junho de 2010, missão integrada no projecto “MARINAT- Bactérias Marinhas como Fonte para a Descoberta de Fármacos”, Ref. “PTDC/QUI-QUI/101813/2008. Investigadora Principal, Prof. Dra. Ana Lobo) a uma profundidade média de 13m permitiu a recolha de 513 sedimentos de areia dos quais 20 foram utilizadas para este trabalho.

A Campanha Oceanográfica EMAM/PEPC\_ M@rBis/2011 que decorreu entre 16 de Junho e 18 de Julho de 2011, na qual a autora (Sara Pereira) fez parte da equipa, e organizada pela Estrutura de Missão para os Assuntos do Mar (EMAM) permitiu a recolha de 14 sedimentos de areia nos arquipélagos da Madeira e Açores. A profundidade média de recolha em mergulho nestes locais foi de 30 m, apresentando os seguintes códigos de acordo com o local de recolha: FC-Funchal, FG-Formigas PS-Porto Santo e SM-Santa Maria. Pretende-se fazer um estudo comparativo entre as amostras recolhidas nos dois arquipélagos sobre o ponto de vista microbiológico e taxonómico de forma a avaliar o potencial dos recursos presente nos sedimentos oceânicos da plataforma continental português. Adicionalmente, efectuamos em Sesimbra a recolha de outros 6 sedimentos em apneia.

Cada sedimento foi colocado no local da recolha, em sacos de plástico de 50 ml estéreis, retirando-se a maior quantidade de água possível. Na embarcação de suporte as amostras foram conservadas a 4°C até serem analisadas. Após parte dos sedimentos serem semeadas nos meios de cultura para isolamento bacteriano (ver a seguir), os sacos de recolha com o restante sedimento foram conservados a -20°C.

No âmbito deste trabalho foram estudadas 40 amostras de areia, previamente seleccionadas, provenientes da Madeira, dos Açores e de Sesimbra. Adicionalmente foram estudadas mais 27 estirpes (com diferentes morfologias) isoladas anteriormente de amostras de areia também dos Açores, aumentando a probabilidade de na nossa amostra em estudo termos uma maior biodiversidade bacteriana e provavelmente e maior variabilidade de compostos químicos produzidos.

## 2.2 Isolamento de bactérias dos sedimentos marinhos

As areias foram colocadas em caixas de Petri, durante 24h numa câmara de fluxo laminar para secagem, seguindo-se a sementeira em diferentes meios de cultura (A1, SWA, ½A1 e M1 descritos a seguir) para propagação das bactérias.

A sementeira foi efectuada por dois métodos diferentes, aqui designados P1, com distribuição uniforme de uma amostra líquida por todo o meio de cultura e P2, com distribuição directa da amostra sólida (a areia) por estampagem.

Descreve-se a seguir os dois métodos. A composição dos meios de cultura e outros materiais está descrita adiante.

### Método de isolamento P1

O método P1 consistiu em retirar cerca de 50g de cada sedimento para um frasco de vidro com cerca de 250µL de água do mar, agitar 5 seg. no vortex para obter células bacterianas no sobrenadante. No centro de cada caixa de Petri com os diferentes meios de cultura colocaram-se 200 µL do sobrenadante recolhido que foi espalhado no mesmo no meio com esferas de vidro estéreis.

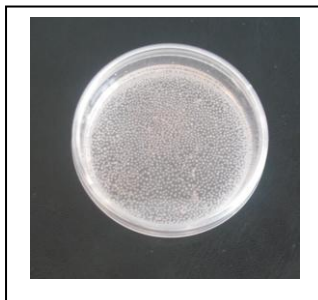
### Método de isolamento P2

No método P2 colocou-se uma pequena quantidade de sedimento distribuído por toda a caixa através de estampagem com bola de algodão estéril da seguinte forma: tocar no meio de cultura com agar com o algodão e depois no sedimento voltando a tocar no agar por sete vezes seguidas de forma a diminuir a concentração celular.

As placas de Petri com os meios A1, SWA, ½A1 e M1 com as amostras semeadas foram incubadas por 30 semanas (Novembro de 2011 a Julho de 2012) entre 28°C e 30°C e foram submetidas a um controlo diário para registo de crescimento de colónias e observação da sua morfologia. Sempre que foram visíveis colónias de interesse, de acordo com a morfologia, efectuou-se a repicagem dessas colónias para placas com meio A1, sem ciclohexamida por forma a serem isoladas e purificadas.

O meio A1DI (sem água do mar, descrito a seguir) foi apenas utilizado para testar a presença de estirpes do grupo Salinospira (actinomicetos marinhos) nos sedimentos em estudo, uma vez que este é o único género descrito depender de água salgada para o seu crescimento. Deste modo, sempre que havia suspeita de crescimento de colónias de Salinospira em qualquer um dos quatro meios (A1, SWA, ½A1 e M1), as colónias suspeitas eram repicadas para meio A1D1. Caso se observa-se ausência de crescimento, considerou-se a estirpe pertencer aquele grupo.

A propagação em meio líquido de células das estirpes purificadas foi efectuada do seguinte modo e em dois tipos de meio de cultura líquido (A1 e BFe+C). Retirou-se uma colónia isolada com uma ansa descartável para dois balões de vidro com 25 mL de cada meio líquido. Os balões com as suspensões celulares foram incubados a 28°C com agitação a 110 rpm, até se observar turvação da cultura bacteriana (ver figura 2.1).



**Figura 2.1.** Imagem de uma cultura propagada em meio líquido A1 (deste trabalho)

Nove réplicas de 1mL de cada cultura propagadas em meio de cultura A1 foram conservadas em 10% de glicerol a -80°C.

A restante cultura propagada em cada meio (volumes finais de 25 mL) foi transferida para balões de 2L cada um com 1L de meio A1 ou A1bfe+C líquido e foi incubada a 28°C, durante sete dias com agitação.

### **2.3. Extração de extratos ou crudes**

Após o crescimento das culturas em meio líquido, iniciou-se a extração de compostos de forma a obter os crudes finais. A extração química de compostos partiu de uma decantação simples. O meio de cultura foi colocado num balão de decantação com 2L de capacidade e extraiu-se os compostos com cerca de 1L de acetato de etilo. Antes de se iniciar a decantação, mediu-se o pH das culturas com papel de pH devendo o valor situar-se entre 7.0 e 8.0. Depois de se descartar o material celular, a mistura restante foi colocada num balão de 500 mL e deixada a evaporar no rotavapor. O peso dos extractos finais, foi registado posteriormente à secura das amostras em vácuo (ver figura 2.2).



**Figura 2.2** Imagem representativa de extractos químicos extraídos de quatro culturas bacterianas diferentes (deste trabalho)

## **2.4 Determinação da actividade antimicrobiana dos extractos ou crudes**

Para avaliação do potencial biotecnológico das estirpes em estudo, foi avaliada a actividade antimicrobiana dos seus extratos por determinação da concentração mínima inibitória (MIC-Minimal Inibitory Concentration).

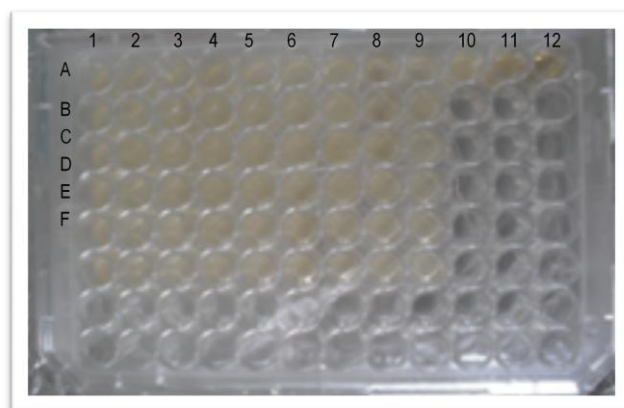
### **2.4.1 Patogénicos utilizados nos testes biológicos**

Para os testes biológicos de avaliação da actividade dos compostos foram utilizados duas estirpes bacterianas de Gram positivo multirresistentes: COL, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA, de Methicillin-Resistant *S. aureus*), e EF82, *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina (VRE, de Vancomycin-Resistant Enterococci), cedidas pela Prof. Herminia de Lencastre (ITQB/UNL) e Prof. Rosario Mato (FCT/UNL), respectivamente, pertencentes à colecção de culturas do laboratório do Dep. Ciências da Vida (DCV) (Resp. Ilda Sanches).

Os procedimentos seguidos foram de acordo com os recomendados pelo “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2007) para avaliação da susceptibilidade antimicrobiana.

### **2.4.2 Avaliação da Concentração Mínima Inibitória (MIC)**

O MIC foi definido como a concentração mínima de composto capaz de inibir o crescimento bacteriano, após o período de incubação apropriado. A actividade antibacteriana dos compostos químicos presentes nos extractos foi avaliada através do teste de microdiluição em placas de 96 poços (ver figura 3).



**Figura 2.3.** Ilustração da placa de 96 poços com amostras para avaliação do valor da concentração mínima inibitória de cada extracto em estudo com culturas bacterianas indicadoras (Methicillin-Resistant *S. aureus*), e EF82, *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina (VRE, de Vancomycin-Resistant Enterococci (deste trabalho).

Nos 10 primeiros poços da fila A adicionou-se 195  $\mu\text{L}$  de meio BHI com 5  $\mu\text{L}$  cultura bacteriana MRSA ou VRE.

Nos 9 primeiros poços fila B a F adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de meio BHI e misturou-se com 100  $\mu\text{L}$  da suspensão correspondente de amostra da fila A, nas colunas 1 a 9.

Nos nove primeiros poços da fila A adicionou-se 5  $\mu\text{L}$  de cada extracto químico em estudo e diluiu-se cada crude de 1:1 em 100  $\mu\text{L}$  de BHI até a linha F.

No 11º poço da fila A adicionou-se 5  $\mu\text{L}$  de DMSO [10mg/mL], e no 12º poço adicionou-se 5  $\mu\text{L}$  de vancomicina [1mg/mL].

Deixou-se a placa a incubar por 18h a 37°C.

Para controlo da esterilidade do meio, as estirpes bacterianas Gram positivas foram inoculadas previamente em 10 mL de meio líquido BHI e incubadas por 24h a 37°C. As culturas bacterianas utilizadas para avaliação do MIC apresentavam uma densidade óptica (D.O.) a 600nm entre 0,04 e 0,06 nm (depois de diluições da cultura original quando esta tinha um valor de D.O.<sub>600</sub> superior). Esta D.O. entre 0,04 e 0,06 nm corresponde a aproximadamente a  $3 \times 10^7$  CFU/mL.

Os extractos químicos a testar, foram preparados dissolvendo-se 1mg de cada um em 100mL de Dimetil Sufóxido (DMSO) [10mg/mL]. Uma vez que as misturas foram diluídas sequencialmente na proporção 1:1, foram testadas concentrações de cada extrato entre 10ug/mL e 0,365 ug/mL.

De acordo com o procedimento ilustrado e descrito na figura 3 após um período mínimo de incubação a 37°C, a diferença na turvação observada em cada poço foi registada para determinação do MIC de cada extracto químico.

### **2.4.3 Avaliação do efeito bacteriolítico ou bacteriostático dos extractos químicos**

Para verificar a capacidade bacteriolítica (conduz à lise celular) ou bacteriostática (inibe a propagação) de cada composto químico fizeram-se ensaios em meio líquido e meio sólido, como se descreve a seguir. Em meio líquido pretende-se observar de novo turvação ou transparência do meios de cultura e em meio sólido pretendeu-se adicionalmente determinar valores de unidades formadoras de colónias (CFU) utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{CFU/mL} = N \times 1/D \times 1/l$$

(N=nº de colónias contáveis, 1/D= inverso do factor de diluição, l= volume do inóculo)

Deste modo, seleccionaram-se da placa de 96 poços (ver figura 3) as amostras onde o composto inibiu a propagação bacteriana em diferentes concentrações. Destas amostras, retiraram-se 50 µL da mistura para um tubo Falcon® com 5mL de meio de cultura BHI estéril que ficou a incubar por 24h a 37°C. Como este procedimento pretendeu-se avaliar o efeito em meio líquido. Em paralelo, para avaliar o efeito em meio sólido e adicionalmente determinar o número de CFU/mL, colocaram-se gotas de 10µL das amostras não diluídas e após diluições seriadas de 1:10 e/ou 1:100 até 10<sup>-6</sup>, numa placa de Petri (dividida em 24 quadrículas). Procedeu-se do mesmo modo com amostras onde não se verificou alteração da propagação bacteriana.

### **2.5 Ensaios citotóxicos**

Os ensaios para avaliação de citotoxicidade dos compostos químicos foram realizados no Centro de Patogénese Molecular da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa (Prof. Doutora Cecília Rodrigues). Nos ensaios MTS foram avaliados os compostos mais e menos activos produzidos pelas estirpes bacterianas isoladas dos sedimentos marinhos de acordo com a viabilidade celular. As concentrações dos compostos químicos testados foram: 8x10<sup>-5</sup>mg/mL, 3,05x10<sup>-4</sup>mg/mL, 1,22x10<sup>-3</sup>mg/mL, 4,88x10<sup>-3</sup>mg/mL, 1,95x10<sup>-2</sup>mg/mL e 7,81x10<sup>-2</sup>mg/mL contra células cancerígenas provenientes de uma linhagem HTC-116 (linha celular do carcinoma humano colorectal).

### **2.6 Isolamento de DNA bacteriano para PCR**

O DNA foi extraído segundo o protocolo descrito previamente (Aires de Sousa *et al.*, 1996), com pequenas modificações abaixo descritas. Resumidamente, à suspensão celular de 150 µL

em tampão TEG (descrito na secção dos materiais), adicionou-se 7,5 µL lisozima (Sigma) [20mg/mL] e incubou-se a 37°C durante 2h. Um volume de 50µL desta suspensão celular tratada com lisozima foi misturada com e 50 LI de celite (Sigma) em 1LI se 1 ml de tampão de lise I (descrito na secção dos materiais) pH 8.0 deixando-se a agitar por 10 min numa plataforma com agitação lateral, seguido de mistura em vortex durante 5 seg. A mistura foi centrifugada durante 15 seg. a 14000 rpm e desprezou-se o sobrenadante. De seguida, efectuaram-se duas lavagens do *pellet* com 500 µL tampão de lise II (descrito na secção dos materiais) pH 6.4, seguindo-se duas lavagens com 500 LI etanol a 70%. A mistura foi deixada a arejar por 15 seg antes da última lavagem com 500 µL acetona. Entre cada lavagem efectuaram-se misturas em vortex de 5 seg. e centrifugações de 15 seg a 14000 rpm. Após as lavagens, as amostras ficaram a secar por 30 min. à temperatura ambiente. Novamente tratou-se as amostras com 100 µL de 10 mM Tris HCl (descrito na secção dos materiais) pH 8.0 (descrito na secção dos materiais) seguido de mistura em vortex durante 5 seg. antes de deixar a incubar por 10 min a 56°C. Procedeu-se à última centrifugação de 10 min a 10000 rpm e o sobrenadante (DNA) foi pipetado para novo eppendorf.

Procedeu-se à quantificação da concentração de DNA em espectrofotómetro UV/VIS (NanoDrop 2000, Thermo Scientific®, Wilmington. As amostras de DNA foram conservadas a -20°C.

## 2.7 Amplificação do 16S rRNA pela técnica de PCR

A técnica de PCR foi realizada num termociclador marca Biometra® T1 Thermocycler, Goettingen. Usaram-se primers anteriormente descritos (Lane,1991): primer 27FC (5'PARA 3'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) primer RC1492 (5'para 3'TACGGCTACCTTGTTACGACTT) A mistura de reacção de PCR foi constituída por:

- 1µL de DNA
- 5µL Buffer 10X
- 2 µL de dNTP's [2mM]
- 2 µL primer forward FC27 e primer reverse RC1492 [20pmol].
- 3,5 µL MgCl<sub>2</sub> [50mM]
- 0,5 µL Taq DNA polimerase
- 34 µL de água esterilizada perfazendo um volume final de 50 µL para cada amostra.

Os reagentes acima indicados foram fornecidos pela Invitrogen® Life Technologies S.A., Madrid.

As condições de amplificação por PCR utilizado foram as seguintes:

- 2 seg. a 95°C

30 seg. a 95°C  
30 seg. a 50°C  
100 seg. a 72°C  
10 seg. a 72°C

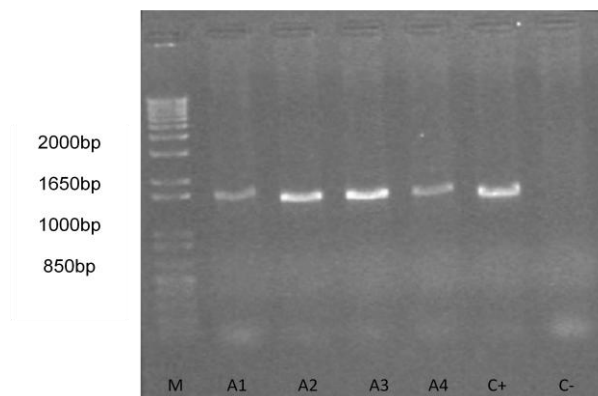
} 30 ciclos

Mantiveram-se os produtos a 16°C até utilização

Foi utilizado DNA da estirpe MRSA COL purificado como controlo positivo e água esterilizada para controlo negativo.

A avaliação da qualidade e estimativa da dimensão (em bp) dos produtos de PCR (ver figura 2.4) foi realizada por electroforese com gel de agarose (1% de agarose em tampão TBE 1X (descrito na secção dos materiais), com condições variáveis (60V e 100V) de voltagem e tempo de migração (45min a 1h). O tampão de arrastamento usado foi constituído por azul de Bromofenol Merck®, Darmstadt misturado com 4 ul de solução Gel Red™ Biotium, Hayward. O marcador de peso molecular usado foi 1 Kb Plus DNA Ladder Invitrogen® Life Technologies S.A., Madrid.

As imagens da migração electroforética foram observadas com sistema de captação de imagem GEL DOC™ BioRad, Hercules.



**Figura 2.4** Confirmação da amplificação do gene 16S rDNA e estimativa da dimensão do produto de PCR por electroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X. As amostras foram misturadas com solução de Gel Red antes de carregadas no gel. O marcador molecular utilizado foi de 1 Kb

M- marcador 1 Kb A# nº da amostra C+ controlo positivo C- controlo negativo

## 2.8 Purificação de produtos de PCR

Os produtos de PCR foram purificados com o kit de purificação *JETquick Spin Column Technique*, Genomed®, Löhne, de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. Resumidamente, misturaram-se 400 µL de solução H1 (Binding Solution – Genomed) (descrito na secção dos materiais) aos produtos de PCR. A mistura foi centrifugada a 12000 rpm durante 1min em colunas de purificação descartando-se o filtrado. Inseriu-se as colunas de purificação

em novos eppendorfs de 2 ml e adicionou-se 500 µL da solução H2 (Wash Solution - Genomed) (descrito na secção dos materiais). Esta nova mistura foi centrifugada a 12000 rpm durante 1min, descartando-se o filtrado. Para a eluição dos solventes, dispôs-se as colunas em eppendorfs aos quais se adicionou 50 µL de buffer TE (descrito na secção dos materiais). A mistura foi centrifugada a 12000 rpm durante 2 min. Por fim, recolheu-se os ácidos purificados para quantificação em espectrofotómetro UV/VIS (NanoDrop 2000, Thermo Scientific®, Wilmington).

## 2.9 Sequenciação do 16S rDNA

A sequenciação dos produtos de PCR foi realizada na empresa STABVida, Setúbal utilizando o método de Sanger (Sanger, 1977) com o sequenciador automático ABI 3730 XL Applied Biosystems®, Carlsbad. Os primers utilizados foram os mesmos que para a amplificação do gene (ver secção 2.7).

## 2.10 Análise Filogenética

As sequências nucleotídicas (*forward* e *reverse*) foram analisadas com *software* Chromas Pro Applied Biosystems para construção de sequências consenso em conjunto com o *software* BioEdit Sequence Alignment Editor (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). As sequências consenso foram comparadas com as sequências correspondente mais próximas da base de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI - <http://ncbi.nlm.nih.gov/Genomes/index.html>) depositadas no GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)). O alinhamento das sequências foi efectuado através do programa Clustal X *Multiple sequence alignment* ([www.ebi.ac.uk/clustalw/](http://www.ebi.ac.uk/clustalw/)). A identificação taxonómica por similaridade foi realizada através da ferramenta BLAST Basic Local Alignment Search Tool, disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). O valor percentual de identidade máxima para cada espécie foi registado para identificação das relações filogenéticas.

As árvores filogenéticas foram construídas e análise filogenética foi efectuada através do programa TreeView X disponível em <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>.

## 2.11 Materiais

Os meios de cultura e outros materiais, como tampões e soluções foram esterilizados em autoclave, a 120°C, durante 20 min, excepto quando especificado de outro modo. Os meios de cultura depois de autoclavados e antes de serem usados, foram suplementados com 20 ml de ciclohexamida [5mg/ml] por litro. A água do mar para preparação dos meios foi recolhida manualmente na zona balnear da Costa da Caparica e filtrou-se sob pressão com filtro de 2m $\mu$  e foi também autoclavada como descrito. A solução de glicerol a 50% (em água) foi esterilizada a 110°C, em autoclave, durante 25 min.

### Meios de Cultura

Todos os meios de cultura foram preparados como descrito (Gontang *et al.*, 2007 e Prieto-Davó, *et al.*, 2008). Os meios de cultura líquidos foram preparados como se descreve, sem adição de agar. A composição dos meios de cultura é a seguinte:

#### Meio A1 (1L)

750 ml água do mar  
250 ml água desionizada  
10 g de amido (Difco, Michigan USA)  
4,0 extracto de levedura (Becton, Dickinson, USA)  
2,0 g peptona (Becton, Dickinson, USA)  
18 g agar (Iberagar, Coima Portugal)

#### Meio SWA (1L)

750 ml água do mar  
250 ml água desionizada  
18 g agar Comercial Agar 10 Iberagar

#### Meio ½A1 (1L)

750 ml água do mar  
250 ml água desionizada  
5,0 g de amido (Difco, Michigan USA)  
2,0 extracto de levedura (Becton, Dickinson, USA)  
1,0 g peptona (Becton, Dickinson, USA)  
9,0 g agar (Iberagar, Coima Portugal)

#### Meio M1 (1L)

750 ml água do mar  
250 ml água desionizada  
1,0 g de amido (Difco, Michigan USA)  
0,4 g extracto de levedura (Becton, Dickinson, USA)  
0,2 g peptona (Becton, Dickinson, USA)  
18,0 g agar (Iberagar, Coima Portugal)

#### Meio A1bfe+C

750 ml água do mar  
250 ml água desionizada  
10 g de amido (Difco, Michigan USA)  
4,0 extracto de levedura (Becton, Dickinson, USA)  
2,0 g peptona (Becton, Dickinson, USA)  
5  $\mu$ g Brometo de potássio (KBr)  
5  $\mu$ g Sulfato de Ferro (FeSO<sub>4</sub>)  
1 g Carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>)

#### Meio A1DI

1000 ml água desionizada  
10 g de amido (Difco, Michigan USA)  
4,0 extracto de levedura (Becton, Dickinson, USA)  
2,0 g peptona (Becton, Dickinson, USA)  
18,0 g agar (Iberagar, Coima Portugal)

#### Meio BHI (Brain Heart Infusion)

1L água desionizada  
37,0g de meio BHI (Difco, Michigan USA)  
15,0 g de agar (Iberagar, Coima Portugal)

### **Tampões e Soluções**

#### Tris HCL 10mM pH 8,0

0,12 g de Tris para 100 ml de água destilada  
Acertar pH com HCL 0,1N

#### Etanol 70%

70ml de etanol absoluto  
30ml de água destilada

#### Tampão TEG

50mM glucose  
25 mM Tris  
10mM EDTA

#### Tampão de lise I

120g de guanidina isotiocianeto (4M)  
100 ml 0,1M Tris-HCL pH 6,4  
22 ml 0,2M EDTA pH 8,0  
1ml Triton X-100

#### Tampão de lise II

120g de guanidina isotiocianeto (4M)  
100 ml 0,1M Tris-HCL pH 6,4

#### Lisozima (125mg/ml)

125mg lisozima em 1ml de água destilada

#### Celite

1g de celite  
5ml de água destilada  
50µl de HCL concentrado 37%

#### TBE (Tris-Borate EDTA) buffer

0.089 M Tris borato  
0.089 M ácido bórico  
0.002 M EDTA

#### Tampão de carga Azul de Bromofenol 6x

0,25 % Bromofenol,  
0,25 % Xileno Cianol,  
30 % Glicerol pH 8,0



### 3. Resultados

#### 3.1 Propagação de culturas bacterianas

Das 40 amostras de areia semeadas foi possível isolar 36 estirpes morfolologicamente distintas das três regiões geográficas (Madeira, Açores e Sesimbra). Das amostras provenientes da região dos Açores (n=20) foram isoladas 13 estirpes, das amostras de Sesimbra (n=6) isolamos 12 estirpes isoladas, e das amostras da região da Madeira (n=14) isolaram-se 8 estirpes, em particular, foi isolada uma estirpe de cada uma das áreas geográficas, Porto Santo, Funchal e Formigas.

As estirpes bacterianas apresentam morfologias bastante varáveis (ver figura. 3.1), com coloração bege, amarela, laranjas e vermelha e esporos com coloração variante entre branco, bege, cinzento e azul morfologia predominante foi sem dúvida a colónia bege com esporos cinzentos (14 estirpes) seguida de colónias laranjas com esporos laranjas (6 estirpes). As estirpes morfolologicamente mais semelhantes ao grupo de actinomicetos marinhos (*Salinospora*), ou seja colónias laranja com esporos pretos, distribuíam-se por todas as regiões em estudo.



**Figura 3.1** Ilustração das diferentes morfologias bacterianas isoladas em meio A1 (deste trabalho)

Foi também possível observar diferenças no tempo de propagação de bactérias em meio sólidos e que existem alterações morfológicas ao longo do tempo, geralmente as colónias com estruturas visíveis semelhantes esporos brancos ao longo do tempo iam tornam-se cinzentos.

O meio de cultura A1 revelou-se muito adequado ao crescimento de organismos unicelulares sem interesse, contrariamente ao meio de cultura SWA que foi o meio mais selectivo para actinomicetos. O meio SWA (pobre em nutrientes) foi também onde se verificou propagação de colónias mais lento. Os meios  $\frac{1}{2}$ A1 e M1 permitiram o desenvolvimento de colónias bastante semelhantes morfolologicamente.

Em relação à propagação de colónias em meio A1D1 todas as estirpes avaliadas quanto à sua propagação neste meio de cultura desprovido de água do mar, apresentaram um comportamento semelhante às estirpes homólogas presentes nas placas de Petri primárias.

Em relação aos métodos utilizados para semear as amostras de areia para isolamento bacteriano, o método P2 foi o que permitiu uma maior separação de actinomicetos por placa de Petri facilitando o isolamento de colónias.

### 3.2 Extractos químicos obtidos

Das culturas bacterianas propagadas em meio líquido A1 e A1Bfe+C foi possível obter 45 extractos químicos provenientes das culturas em meio A1 e 26 provenientes de culturas em meio A1Bfe+C num total de 71 extractos. Estes extractos foram submetidos a ensaios de citotoxicidade e de avaliação de actividade antimicrobiana. De forma a facilitar a leitura de resultados, a cada extracto químico foi atribuído um código que o associa à estirpe isolada de onde foi obtido. Assim o código PTA0#A está associado a uma cultura bacteriana que foi propagada em meio líquido A1 e o código PTA0#B associado a uma cultura em meio líquido A1Bfe+C. Os códigos CNX# ou CNY# correspondem a estirpes em meio líquido A1.

### 3.3 Ensaio citotóxicos

Em relação aos ensaios citotóxicos, num total de 50 extractos químicos testados, oito apresentaram valores de IC<sub>50</sub> inferior a 10 µg/mL. Nos resultados apresentados constam os compostos mais activos com base numa redução de viabilidade superior a 80% para a penúltima dose mais elevada 0,0195mg/L. As estirpes de onde se isolaram estes extractos são as seguintes: PTA004B, PTA005A, PTA008B, PTA010A, PTA016B, PTA018A, PTA019A e PTA027A (ver tabela 3.1)

**Tabela 3.1** Amostras e respectivos valores de IC<sub>50</sub> inferiores a 10 µg/mL

Código da amostra	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
PTA004B	4,25
PTA005A	1,33
PTA008B	7,05
PTA010A	1,89
PTA016B	5,46
PTA018A	6,51
PTA019A	2,43
PTA027A	3,37

O composto presente na amostra PTA005A foi o composto com maior actividade citotóxica IC<sub>50</sub>=1,33 µg/mL. Nove dos restantes extractos diminuíram a viabilidade celular em 50% com valores de IC<sub>50</sub> calculados entre 13,95 µg/mL e 39,07 µg/mL. 33 dos demais extractos não alteraram a viabilidade celular da linha cancerígena testada.

### 3.4 Actividade antimicrobiana

Foram analisados 71 extractos químicos para avaliação de actividade antimicrobiana. Destes extractos, 12 (24%) provenientes da cultura das estirpes em meio líquido A1 e um extracto proveniente da cultura de estirpe em meio A1BFe+C apresentaram actividade antimicrobiana ou seja em pelo menos uma das concentrações testadas a propagação das estirpes bacterianas de Gram positivo multirresistentes foi inibida. Verificou-se que o mesmo extracto químico produzido pode não ter igual capacidade de inibição de crescimento para VRE e MRSA.

As diferenças entre a capacidade de inibição de crescimento que se verificam à medida que o composto químico foi diluído permitiram determinar o valor de MIC. As estirpes onde se verificou actividade antimicrobiana são as seguintes: PTA001A, PTA005A, PTA017A, PTA020A, PTA021A, PTA026A, PTA031A, PTA031B, PTA032A, CNY127, CNY130 e CNY874. O valor de MIC determinados para estas amostras (ver tabela 3.2), tanto para MRSA e VRE, abrangem concentrações desde 0,25µg/ml até  $7,8 \times 10^{-3}$  µg/ml.

**Tabela 3.2** Valores da concentração mínima inibitória dos extractos químicos para cada cultura bacteriana indicadores Methicillin-Resistant *S. aureus*, e EF82, *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina (VRE, de Vancomycin-Resistant Enterococci)

Amostras	MIC MRSA (µg/ml)	MIC VRE (µg/ml)
PTA001A	<0,25	<0,25
PTA005A	$<7,8 \times 10^{-3}$	<0,0156
PTA017A	<0,125	<0,125
PTA020A	<0,125	<0,0625
PTA021A	<0,25	<0,25
PTA026A	<0,25	<0,25
PTA031A	<0,0313	$<7,8 \times 10^{-3}$
PTA031B	$<7,8 \times 10^{-3}$	$<7,8 \times 10^{-3}$
PTA032A	<0,125	<0,0156
PTA034A	$<7,8 \times 10^{-3}$	$<7,8 \times 10^{-3}$
CNY127	>0,25	<0,25
CNY130	<0,0313	<0,0313
CNY874	>0,25	<0,25

Os compostos com maior capacidade inibitória são os que estão presentes nas amostras PTA031B e PTA034A ( $MIC_{MRSA/VRE}=7,8 \times 10^{-3}$  µg/mL) seguido de PTA0005A ( $MIC_{MRSA}=7,8 \times 10^{-3}$  µg/mL  $MIC_{VRE}=0,0167$ µg/mL

Estes compostos químicos quando avaliados quanto à sua actividade bacteriolítica ou bacteriostática, à excepção do composto presente na amostra PTA034A, permitiram a recuperação da viabilidade celular bacteriana e por isso foram considerados bacteriostáticos. O efeito bacteriolítico pelo composto presente na amostra PTA034A, e que inviabilizou as células bacterianas em meio líquido foi também verificado na placa de Petri após o período de incubação, não qual não se registou propagação de colónias.

### 3.5 Análise Filogenética

Com base na amplificação do gene 16S rDNA e sequências *forward* e *reverse* conseguidas, determinou-se as sequências consenso para 36 estirpes bacterianas isoladas. A análise comparativa das sequências consenso obtidas, com as sequências registadas no GenBank, foi realizada através do algoritmo BLAST, de forma a identificar a percentagem de identidade máxima. As sequências consenso foram usadas para construir à árvore filogenética das espécies identificadas. Algumas sequências não foram utilizadas pois a sequenciação não foi bem sucedida ou, por outro lado, porque apenas existia sequência num sentido, o que iria reduzir o número de bases do alinhamento. Verificou-se que não se isolaram espécies novas (uma vez que os valores de identidades foram sempre superior a 98% (ver tabela 3.3). A sequência do gene 16S rDNA de *Escherichia coli* JX267124 foi utilizada como *outgroup* para referência externa.

Foi possível identificar 8 géneros: *Streptomyces*, *Verrucosispora*, *Micromonospora*, *Pseudonocardia*, *Actinomadura*, *Bacillus*, *Nocardiosis* e *Sulfitobacter*, sendo que o género *Streptomyces* é o mais frequente pois foi identificado em cerca de 30% das estirpes bacterianas isoladas.

**Tabela 3.3** Valores de % de identidade máxima para cada estirpe isolada de acordo com a sequência consenso obtida

Código amostras	Número de acesso	Descrição	% de identidade máxima
CNX873	JQ924108.1	Actinomycetales	99%
CNX874	AB548687.1	<i>Streptomyces coelicoflavus</i>	99%
CNX876	AB184727.2	<i>Streptomyces verne</i>	99%
CNX938	CP002638.1	<i>Verrucosispora maris</i>	99%
CNX949	EU379278.1	<i>Micromonospora echinospora</i>	99%
CNX963	AB583547.1	<i>Micromonospora Coxensis</i>	99%
CNX967	EU196562.2	<i>Micromonospora tulbaghiae</i>	99%
CNX986	GU083570.1	<i>Pseudonocardia petroleophila</i>	99%
CNX988	NR_041164.1	<i>Actinomadura glauciflava</i>	99%

CNY056	HQ291073.1	<i>Actinomadura meyeræ strain</i>	99%
CNY079	HQ857766.1	<i>Bacillus anthracis</i>	99%
CNY090	FJ486467.1	<i>Streptomyces drozdowiczii</i>	99%
CNY091	EU273540.1	<i>Streptomyces flavofungini</i>	99%
CNY092	JQ924090.1	Actinomycetales	99%
CNY94	JQ924108.1	Actinomycetales	99%
CNY126	AB184727.2	<i>Streptomyces verne</i>	100%
CNY127	AB548687.1	<i>Streptomyces coelicoflavus</i>	99%
CNY130	JQ924117.1	Actinomycetales bacterium	99%
CNY131	JQ924108.1	Actinomycetales	100%
CNY132	NR_043574.1	<i>Actinoalloteichus hymeniacidonis</i>	99%
CNY133	JQ924108.1	Actinomycetales	99%
CNY143	EU196562.2	<i>Micromonospora tulbaghiae</i>	99%
CNY167	JQ924102.1	Actinomycetales	99%
PTA003	EU647478.1	<i>Streptomyces anulatus</i>	99%
PTA008	EU593561.1	<i>Streptomyces ambofaciens</i>	100%
PTA009	JQ924410.1	<i>Streptomyces flavofuscus</i>	99%
PTA010	EU196562.2	<i>Micromonospora tulbaghiae</i>	99%
PTA014	JQ924091.1	Actinomycetales	99%
PTA015	NR_044906.1	<i>Nocardiopsis alba</i>	99%
PTA016	JQ806408.1	<i>Sulfitobacter pontiacus</i>	99%
PTA028	JQ924410.1	<i>Streptomyces flavofuscus</i>	99%
PTA029	JQ924108.1	Actinomycetales	99%
PTA030	JN392409.1	<i>Streptomyces chrestomyceticus</i>	99%

Pela análise do dendrograma podemos avaliar as relações filogenéticas entre as estirpes bacterianas isoladas, que permitiu a formação de diferentes grupos relacionado com o nível de similaridade. Verifica-se que o grupo mais distante corresponde ao código da amostra PTA016 identificada como *Sulfitobacter pontiacus*.



**Figura 3.2** Dendrograma das relações filogenéticas bactérias baseado nas sequências do gene 16S rDNA de cada estirpe isolada

**Tabela 3.4** Estirpes identificadas e respectivos números de acesso

<b>Estirpes</b>	<b>Nº de acesso</b>	<b>Descrição</b>
<b>CNY056</b>	FN646647.1	<i>Actinomadura cremea</i>
	HQ291073.1	<i>Actinomadura meyeræ</i>
	AJ420140.1	<i>Pseudonocardia alaniniphila</i>
	NR_041618.1	<i>Actinomadura formosensis</i>
	FN646647.1	<i>Actinomadura bangladeshensis</i>
<b>CNY079</b>	JX310187.1	<i>Bacterium NLAE-zl-P444</i>
	FJ889535.1	<i>Bacillus pseudomycoïdes</i>
	JQ045837.1	<i>Bacillus mycoïdes</i>
	EU016167.1	<i>Bacillus samanii</i>
	HQ833025.1	<i>Bacillus cereus</i>
	JF772102.1	<i>Bacillus anthracis</i>
<b>CNY090</b>	HQ662223.1	<i>Streptomyces sp.</i>
	FJ486467.1	<i>Streptomyces drozdowiczii</i>
	NR_041417.1	<i>Streptomyces sanglieri</i>
	FJ481627.1	<i>Streptomyces naraensis</i>
	AB184391.2	<i>Streptomyces setonensis</i>
	NR_043490.1	<i>Streptomyces atratus</i>
<b>CNY92</b>	JQ812104.1	<i>Streptomyces sp. QZGY-A47</i>
	JN652249.1	<i>Streptomyces anulatus</i>
	JQ924403.1	<i>Streptomyces praecox</i>
	EU273550.1	<i>Streptomyces violascens</i>
	EU273539.1	<i>Streptomyces fimicarius</i>
	AB712352.1	<i>Streptomyces sampsonii</i>
	JX007992.1	<i>Streptomyces somaliensis</i>
	AY999889.1	<i>Streptomyces caviscabies</i>
	AF112160.1	<i>Streptomyces parvus</i>
	<b>CNY130</b>	JN049488.1
<b>CNY167</b>	JQ009382.1	<i>Streptomyces sp. SLs1</i>
	NR_044035.1	<i>Streptomyces xiamenensis</i>
<b>CNY133</b>	HM001295.1	<i>Actinoalloteichus sp. TSI127</i>
	NR_043574.1	<i>Actinoalloteichus hymeniacidonis</i>
	GQ926935.1	<i>Actinoalloteichus nanshanensis</i>
	NR_042898.1	<i>Actinoalloteichus spitiensis</i>
	NR_297963.1	<i>Goodfellowia coeruleoviolacea</i>
<b>CNX873</b>	NR_JQ924108.1	<i>Actinomycetales bacterium</i>
<b>CNX874</b>	HQ684742.1	<i>Streptomyces sp.</i>
	AB548687.1	<i>Streptomyces coelicoflavus</i>
	EF371437.1	<i>Streptomyces graminearus</i>
	EU593733.1	<i>Streptomyces thermocarboxydus</i>
<b>CNX876</b>	AB184727.2	<i>Streptomyces verne</i>
	AB184831.1	<i>Streptomyces halstedii</i>
	AB184828.1	<i>Streptomyces scabiei</i>
	AB184788.1	<i>Streptomyces fimicarius</i>

	NR_041173.1	<i>Streptomyces griseolus</i>
	AB184727.2	<i>Streptomyces cinereorectus</i>
	JX013966.1	<i>Streptomyces flavolimosus</i>
	JQ422133.1	<i>Streptomyces microflavus</i>
	AB184187.1	<i>Streptomyces argenteolus</i>
<b>CNX963</b>	AB583547.1	<i>Micromonospora coxensis</i>
<b>CNX949</b>	JQ688016.1	<i>Micromonospora sp. Tc3-36</i>
<b>CNX986</b>	EF216350.1	<i>Pseudonocardia sp. TFS 575</i>
	GU083570.1	<i>Pseudonocardia petroleophila</i>
	JN180176.1	<i>Pseudonocardia alaniniphila</i>
	GU083569.1	<i>Pseudonocardia hydrocarbonoxydans</i>
	NR_041999.1	<i>Pseudonocardia yunnanensis</i>
<b>CNX938</b>	AY360149.1	<i>Verrucosipora sp.</i>
	NR_026445.1	<i>Verrucosipora gifhornensis</i>
	AY528866.1	<i>Verrucosipora maris</i>
<b>PTA003</b>	EU257282.1	<i>Streptomyces sp. A463Ydz-ZZ</i>
	JX013965.1	<i>Streptomyces parvus</i>
<b>PTA010</b>	JF439407.1	<i>Micromonospora sp. HBUD30208</i>
	JN545845.1	<i>Micromonospora chaiyaphumensis</i>
	X92595.1	<i>Micromonospora purpurea</i>
	EU379278.1	<i>Micromonospora echinospora</i>
	JN180157.1	<i>Micromonospora tulbaghiaie</i>
	JF439407.1	<i>Nocardiopsis alba</i>
	AB562481.1	<i>Nocardiopsis alba</i>
	EU368816.1	<i>Prauseria sp. A321</i>
<b>PTA016</b>	JX310187.1	<i>Sulfitobacter sp. 148Z</i>
	FJ889535.1	<i>Sulfitobacter sp.</i>
	JQ045837.1	<i>Sulfitobacter pontiacus</i>
	EU016167.1	<i>Sulfitobacter marinus</i>
<b>PTA030</b>	AB671563.1	<i>Streptomyces sp.</i>
	JN392409.1	<i>Streptomyces chrestomyceticus</i>
	NR_025620.1	<i>Streptomyces sclerotialis</i>

## 4 Discussão

As técnicas e meios de cultura utilizados para a realização deste trabalho, factores que podem condicionar a descoberta ou não de novos compostos, mostraram-se eficazes tal como já tem vindo a ser descrito pela bibliografia (Jensen, 2005 e Gontang, 2007). Podemos afirmar que houve uma elevada percentagem de sucesso no isolamento de actinomicetos (90%) dos 40 sedimentos marinhos semeados. O meio SWA (pobre em nutrientes) foi o mais selectivo para crescimento de actinomicetos, pois inibia o crescimento de organismos unicelulares em interesse e facilitava a propagação de actinomicetos e posterior isolamento. Verificou-se também que a cultura de bactérias em meios líquidos diferentes, no caso deste trabalho A1 e A1BFe+C, aumentam a produção de compostos químicos diversificados como se verifica nos resultados obtidos. Compostos produzidos pela mesma estirpe, mas propagada em meios de cultura com diferentes nutrientes, actuam de forma distinta quando avaliados quanto ao efeito citotóxico e capacidade de inibição de cada cultura bacteriana Methicillin-Resistant *S. aureus*, ou EF82, *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina (VRE, de Vancomycin-Resistant Enterococci).

Os resultados avaliação do crescimento bacteriano em meio A1DI estão de acordo com a bibliografia (Jensen, *et. al.*, 2005). As estirpes isoladas com morfologia cor de laranja e esporos pretos (semelhante ao género *Salinospora*) repicadas para este meio de cultura indicaram que o grupo *Salinospora* não estava presente nas amostras de sedimento marinho, o que se veio a confirmar pela análise da sequenciação do gene 16S rDNA.

As estirpes PTA004B, PTA005A, PTA008B, PTA010A, PTA016B, PTA018A, PTA019A e PTA027A apresentaram valores de IC<sub>50</sub> inferiores a 10µg/mL contra as células do carcinoma HTC-116 utilizadas. O que é considerado como promissor na linha do desenvolvimento de novas drogas anticancerígenas (Suffness e Pezzuto, 1990). É de notar, que as restantes amostras com valores superiores a 10µg/mL e que mostraram diminuir a viabilidade celular em 50% com valores de IC<sub>50</sub> calculados entre 13,95 µg/mL e 39,07 µg/mL, podem contra outra linhagem de células podem revelar valores de toxicidade interessantes para os mesmos compostos (Suffness e Pezzuto, 1990).

Os resultados apresentados através do cálculo do MIC revelam promissores resultados para o estudo do combate a estirpes bacterianas resistentes à vancomicina (Haste, 2010). O método de microdiluição em placa provou ser eficaz tendo em conta que requer pouca quantidade de extracto químico e permitiu calcular a concentração mínima inibitória. Também no combate a bactérias multirresistentes e reaparecimento de patologias que se julgavam erradicadas, os actinomicetos já provaram estar a dar os primeiros passos para travar esta situação emergente (Bode, *et al.*, 2002).

Podemos também concluir que compostos com uma maior taxa de citotoxicidade, não têm que obrigatoriamente apresentar a maior actividade antimicrobiana e avaliando em paralelo os resultados de ambos os ensaios, conseguimos perceber em que amostras devemos procurar um composto antimicrobiano ou por outro lado, isolar o composto de actividade citotóxica.

Em relação à diversidade taxonómica, nas amostras processadas podemos afirmar que a identificação de oito géneros diferentes foi um bom resultado. A forte presença do género *Streptomyces* entre os isolados obtidos das amostras (cerca de 20%) é compatível com outros resultados de isolamento de actinomicetes provenientes de sedimentos marinhos. Por sua vez, a presença de oito géneros pertencentes à classe Actinobacteria demonstra que os métodos e técnicas utilizadas são apropriados este tipo de estudos (Jensen, 2005 e Gontang, 2007).

Actualmente não há forma de prever se os compostos isolados podem ter ou não interesse para a indústria farmacêutica, no entanto, os resultados aqui apresentados são os que podem ditar se estamos perante um novo composto ainda não estudado.

Futuramente ao prosseguir com estudos sobre os extractos isolados, deverá proceder-se à elucidação estrutural dos compostos presentes nas amostras com interesse bioquímico. Será útil verificar se em algum dos extractos químicos estará presente algum grupo químico conhecido de alcalóides ou quinonas. Os alcalóides são compostos que entre outros, interferem com os microtúbulos e por sua vez com a divisão celular levando à indução da apoptose celular, por outro lado, derivados da quinona interferem no DNA e replicação do RNA (Ravikumar S. *et al.*, 2012).

Há também um interesse específico em realizar estudos comparativos de biodiversidade de bactérias marinhas provenientes de sedimentos oceânicos colhidos nos arquipélagos dos Açores e Madeira de forma a aumentar o conhecimento sobre a distribuição destes microorganismos.

## 5 Bibliografia

- Aires de Sousa M., Sanches I., van Belkum A., van Leeuwen W., Verbrugh H. e de Lencastre H., 1996. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Portuguese hospitals by multiple genotyping methods. *Microbiology Drug Resistance* 2 (3): 331-41.
- Berdy, J., 2005. Bioactive microbial metabolites. *Journal of Antibiotics* 58:1-26.
- Bhatnagar, I. Kim, 2010. Marine Antitumor drugs: Status, shortfalls and strategies. *Marine Drugs* 8: 2702-2720.
- Bode, H. B., Bethe, R. Hofs e Zeeck A. 2002. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *ChemBioChem* 3: 619-27.
- Feling R., Buchanan G., Mincer T., Jensen P. e Fenical W. 2003. Salinosporamide A: A highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinospora*. *Angewandte Chemie* 42: 355-357.
- Bull, A., Goodfellow, M. e Slater, J., 1992. Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. *Annual Reviews Microbiology* 46: 219-152.
- Bull, A. Ward, A. e Goodfellow, M. 2000. Search and discovery strategies for biotechnology: The paradigm shift. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64: 573-606
- Chalis, G. e Hopwood, D., 2003. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proceedings Natural Academy Science* 100: 14555-14561.
- Chambers, H., MacMillan, J., Gaudêncio, S. Jensen, P. e Fenical, W., 2009. The ammosamides: structures of cell cycle modulators from a marine derived *Streptomyces* species. *Chemie* 48: 725-727.
- Demain, A. e Sanches, S. 2009. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The Journal of Antibiotics* 62: 5–16
- Feling RH, Buchanan GO, Mincer TJ, Kauffman CA, Jensen PR, Fenical W 2003. "Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *salinospora*". *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 42 (3): 355–7.
- Fenical, W. 1993. Chemical studies of marine bacteria: Developing a new resource. *American Chemical Society* 93: 1673-1683.
- Fenical, W., Jensen, P. Palladino M., Lam, K., Lloyd e Potts, B. G. 2009. Discovery and development of the anticancer agent salinosporamide A. *Bioorganic & Medical Chemistry* 17: 2175-2180.
- Freel, K. 2011. Microdiversity and evidence for high dispersal rates in the marine actinomycete *Salinospora pacifica*. *Environmental Microbiology* 14:480-93.
- Gontang, E., Fenical W. e Jensen, P. 2007. Phylogenetic diversity of Gram Positive Bacteria cultured from marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 5: 3272-3282.
- Haste, N., Varahenage, P., Maloney, K., Tran D, Jensen, P. Fenical, W., Nizet, V. e Hensler M., 2010. Activity of the streptogramin antibiotic etamycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antibiotics* 63(5): 219–224.
- Hughes C., MacMillan J., Gaudêncio S., Fenical W. e La Clair J. Ammosamides A and B target myosin. 2009. *Angewandte Chemie* 48(4):728-32
- Hughes, C., Kauffman C., Jensen, P. e William F. 2010. Structures, Reactivities and Antibiotic properties of the marinopyrroles A-F; *Journal Organic Chemistry* 75 (10): 3240–3250.
- Jensen P., Dwight R. e Fenical W. 1991. Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. *Applied Environment Microbiology* 57: 1102–1108.
- Jensen, P. e Fenical, W., 1994. Strategies for the discovery of secondary metabolites from marine bacteria: Ecological perspectives. *Microbiology* 48: 559-584.

- Jensen, J. e Fenical W. 1996. Marine bacterial diversity as a resource for novel microbial products; *Journal of Industrial Microbiology* 17, 346-351.
- Jensen, P. Mincer, T. Williams P. e Fenical, W. 2004, Marine actinomycete diversity and natural product discovery. *Antonie van Leeuwenhoek* 87: 43-48.
- Jensen P. Gontang, E. Mafnas, C. Mincer, T. e Fenical, W. 2005. Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. *Environmental Microbiology* 7 1039-1048
- Jensen, P., Mincer, T., Williams, P. e Fenical, W. 2005b. Marine actinomycete diversity and natural product discovery. *Antonie Leuwenhoek* 87:43-48.
- Jensen P. e Fenical W. 2007. Marine actinomycete bacteria, developing a new resource for drug discovery. *Nature Chemical Biology* 2: 666-673.
- Keller M. and Zengler K., 2004 Tapping into microbial diversity. *Nature Review Microbiology* 2: 141-150.
- Kwon, H. Kauffman, C. Jensen, P. e Fenical, W. 2005. Marionomycins A-D, Antitumor-Antibiotics of a new structure class from a marine actinomycete of recent discovered genus "Marinispora"; *Journal American Chemistry Society* 128: 1622-1632.
- Lam, K. 2006. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Current Opinion in Microbiology* 2006, 9: 245– 251.
- Mincer T., Jensen, P. Kauffman C. e Fenical W. 2002. Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Applied Environmental Microbiology*. 68(10) 5005-5011.
- Newman, D. e Cragg, G., 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years *Journal of Natural products* 70: 461-477.
- Prieto-Davó, A., Fenical, W. e Jensen, P. 2008. Comparative actinomycete diversity in marine sediments. *Aquatic Microbiology Ecology* 52: 1-11.
- Ravikumar S., Fredimoses M. e Gnanadesigan M. 2012. Anticancer property of sediment actinomycetes against MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2 (2): 92-96.
- Riedlinger, J., Reicke, A., Zahner, H., Krismer, B., Bull, A., Maldonado, L., Ward, A., Goodfellow, M. Bister, B. Bischoff, D. Sussmuth, R. e Fiedler H. 2004. Abyssomicins, inhibitors of the paraaminobenzoic acid pathway produced by the marine *Verrucosipora* strain AB-18-032. *Journal of Antibiotics* 57:271-9.
- Stach, J. Maldonado, L. Ward, A. Goodfellow, M. e Bull, A. 2003. Statistical approaches to estimating bacterial diversity in marine sediments. *Applied Environmental Microbiology* 69: 6189-6200.
- Stackebrandt, E. e Schleifer, K. 1984. Molecular systematics of actinomycetes and related organisms. In *Biological, Biochemical and Biomedical of Actinomycetes*, 485-504. (Eds L. Ortiz-Ortiz, L. F. Bojalil and V. Yakoleff).
- Stackebrandt, E., Rainey, F. A. & Ward-Rainey, N. L. 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int J Syst Bacteriol* 47, 479-491.
- Suffness M, e Pezzuto J.1990. Assays related to cancer drug discovery. In *Methods Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity* (Hostettmann K. eds) 6<sup>a</sup> ed., pp: 71-133, Academic Press London.
- Waness, A. 2010. Revisiting Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections. *Journal of Global Infectious Diseases* 2(1): 49–56.

## Anexos

**Anexo 1** Compilação de dados das amostras recolhidas nos arquipélagos dos Açores Madeira e zona costeira de Sesimbra no período de Junho de 2010 e Julho de 2011

<b>Código da estirpe</b>	<b>Nome da amostra</b>	<b>GPS</b>	<b>Morfologia</b>	<b>Meio isolamento sólido</b>	<b>Massa dos extractos (mg)</b>
PTA-001	AZ10-322-A	25° 35,845N 37° 44,565W	Cinzento esverdeado com esporos brancos	A1P2	51,2
PTA-001B	AZ10-322-A	25° 35,845N 37° 44,565W	Cinzento esverdeado com esporos brancos	A1P2	27,0
PTA-002	AZ10-439-A-1	25° 41,005N 37° 43,005W	Cinzento esverdeado com esporos beges	A1P1	51,5
PTA-002B	AZ10-439-A-1	25° 41,005N 37° 43,005W	Cinzento esverdeado com esporos beges	A1P1	37,3
PTA-003	SS11-004-G	38° 28' 37N 8°58'54W	Castanho com esporos brancos	A1P2	52,7
PTA-003B	SS11-004-G	38° 28' 37N 8°58'54W	Castanho com esporos brancos	A1P2	35,1
PTA-004	PS11-004-A	33°03,193N 16°17,042W	Cinzento com esporos brancos e cinzentos	A1P2	33,2
PTA-004B	PS11-004-A	33°03,193N 16°17,042W	Cinzento com esporos brancos cinzentos	A1P2	33,6
PTA-005	SS11-003-C-1	38° 28' 37N 8°58'54W	Branco com esporos cinzentos	A1P2	9,8
PTA-005B	SS11-003-C-1	38° 28' 37N 8°58'54W	Branco com esporos cinzentos	A1P2	40,9
PTA-006	SS11-001-E-1-A	38° 28' 37N 8°58'54W	Bege com esporos cinzentos	A1P2	52,5
PTA-006B	SS11-001-E-1-A	38° 28' 37N 8°58'54W	Bege com esporos cinzentos	A1P2	20,2
PTA-007	SS11-003-G-1	38° 28' 37N 8°58'54W	Bege com esporos cinzentos	A1P1	44,1
PTA-007B	SS11-003-G-1	38° 28' 37N 8°58'54W	Bege com esporos cinzentos	A1P1	19,1
PTA-008	SS11-004-F-1-A-1	36° 56,102N 25°05,526W	Bege com esporos cinzentos e brancos	A1P2	22,6
PTA-008B	SS11-004-F-1-A-1	36° 56,102N 25°05,526W	Bege com esporos cinzentos e brancos	A1P2	38,4
PTA-009	SM11-002-A-1	25° 38,246N 37° 44,619W	Bege com esporos brancos	A1P1	22,5
PTA-009B	SM11-002-A-1	36° 56,102N 25°05,526W	Bege com esporos brancos	A1P1	19,8

PTA-010	AZ10-202-A	25° 35,845N 37° 44,565W	Bege com esporos cinzentos	½ A1P1	4,5
PTA-010B	AZ10-202-A	25° 35,845N 37° 44,565W	Bege com esporos cinzentos	½ A1P1	--
PTA-011	SM11-001-B-1	25° 35,845N 37° 44,565W	Cinzeno com pontos pretos e líquido brilhante	½ A1P2	14,4
PTA-011B	SM11-001-B-1	25° 35,845N 37° 44,565W	Cinzeno com pontos pretos e líquido brilhante	½ A1P2	10,9
PTA-012	AZ10-322-A-1	25° 41,005N 37° 43,005W	Verde cinza com esporos beges	½ A1P1	20,5
PTA-013	AZ10-333-B	36° 56,102N 25° 05,526W	Bege com esporos cinzentos e pontos pretos	½ A1P1	23,4
PTA-013B	AZ10-333-B	36° 56,102N 25° 05,526W	Bege com esporos cinzentos e pontos pretos	½ A1P1	--
PTA-014	AZ10-496-A-1	36° 56,102N 25° 05,526W	Amarelo com esporos brancos	SWAP1	89,7
PTA-015	SM11-001-B-3-A	36° 56,102N 25° 05,526W	Branco com esporos cinzentos	½ A1P2	10,2
PTA-015B	SM11-001-B-3-A	36° 56,102N 25° 05,526W	Branco com esporos cinzentos	½ A1P2	110,5
PTA-016	SM11-003-A-1	25° 35,845N 37° 44,565W	Bege com pontos vermelhos	½ A1P2	27,5
PTA-016B	SM11-003-A-1	36° 56,102N 25° 05,526W	Bege com pontos vermelhos	½ A1P2	19,5
PTA-017	AZ10-352-A-1-B	36° 56,102N 25° 05,526W	Bege com esporos cinzentos e brancos	½ A1P1	14,4
PTA-018	SM11-001-A-1	25° 38,246N 37° 44,619W	Vermelho com esporos cinzentos	½ A1P2	25,9
PTA-018B	SM11-001-A-1	25° 38,246N 37° 44,619W	Vermelho com esporos cinzentos	½ A1P2	84,8
PTA-019	AZ10-202-A	38° 28' 37N 8° 58' 54W	Bege com esporos cinzentos	A1P2	57,5
PTA-020	AZ10-202-B-1	25° 35,845N 37° 44,565W	Bege com esporos brancos	½ A1P1	15,3
PTA-021	SS11-03-D-2-A	36° 56,102N 25° 05,526W	Bege com esporos brancos	A1P2	6,8
PTA-021B	SS11-03-D-2-A	36° 56,102N 25° 05,526W	Bege com esporos brancos	A1P2	34,1
PTA-022	AZ10-333-A	25° 35,845N 37° 44,565W	Cinzeno com esporos cinzentos	½ A1P1	21,6
PTA-023	SS11-003-F-1-A	36° 56,102N 25° 05,526W	Castanho claro com esporos brancos	A1P2	34,7
PTA-023B	SS11-003-F-1-A	36° 56,102N 25° 05,526W	Castanho claro com esporos brancos	A1P2	25,8
PTA-024	SS11-004-G-1-C	36° 56,102N 25° 05,526W	Bege com esporos brancos	A1P2	94,8
PTA-024B	SS11-004-G-1-C	36° 56,102N 25° 05,526W	Bege com esporos brancos	A1P2	120,6
PTA-025	SM11-002-A-1-A-2	25° 38,246N 37° 44,619W	Vermelho com esporos cinzentos	½ A1P2	6,3

PTA-026	SS11-003-I-A	36° 56,102N 25°05,526W	Laranja com esporos pretos	A1P2	43,0
PTA-026B	SS11-003-I-A	36° 56,102N 25°05,526W	Laranja com esporos pretos	A1P2	12,5
PTA-027	AZ10-202-A	25°35,845N 37°44,565W	Laranja com esporos castanhos	SWAP2	23,4
PTA-028	SM11-003-I-1	25° 38,246N 37° 44,619W	Bege com esporos bege e pontos brancos	A1P2	29,9
PTA-028B	SM11-003-I-1	25° 38,246N 37° 44,619W	Bege com esporos bege e pontos brancos	A1P2	29,3
PTA-029	SS11-003-C-1-B	36° 56,102N 25°05,526W	Bege com esporos brancos fofos e pontos pretos	A1P2	10,3
PTA-029B	SS11-003-C-1-B	36° 56,102N 25°05,526W	Bege com esporos brancos fofos e pontos pretos	A1P2	10,0
PTA-030	SS11-004-C-1	36° 56,102N 25°05,526W	Bege com esporos brancos	M1P2	10,5
PTA-030B	SS11-004-C-1	36° 56,102N 25°05,526W	Bege com esporos brancos	M1P2	6,7
PTA-031	AZ10-333-B-1	25° 35,845N 37° 44,565W	Branco com esporos cinzentos e verdes	M1P2	45,4
PTA-031B	AZ10-333-B-1	25° 35,845N 37° 44,565W	Branco com esporos cinzentos e verdes	M1P2	55,7
PTA-032	AZ10-333D-2-A-1	25° 35,845N 37° 44,565W	Laranja	½ A1P1	50,2
PTA-032B	AZ10-333D-2-A-1	25° 35,845N 37° 44,565W	Laranja	½ A1P1	31,6
PTA-033	SS11-005-C	36° 56,102N 25°05,526W	Laranja brilhante	A1P2	48,0
PTA-033B	SS11-005-C	36° 56,102N 25°05,526W	Laranja brilhante	A1P2	10,3
PTA-034	SM11-003-A	25° 38,246N 37°44,619W	Bege com esporos azuis	SWAP2	9,2
PTA-034B	SM11-003-A	25° 38,246N 37°44,619W	Bege com esporos azuis	SWAP2	7,8
PTA-035A	FC11-003-D-1	32° 40.615N 17°05.483W	Laranja com esporos laranja	A1P1	7,0
PTA-035B	FC11-003-D-1	32° 40.615N 17°05.483W	Laranja com esporos laranja	A1P1	25,0
PTA-036A	FG11-001-A-1	37°16.102N 24°15.526W	Laranja com esporos coral	SWAP2	10,7
PTA-036B	FG11-001-A-1	37°16.102N 24°15.526W	Laranja com esporos coral	SWAP2	10,4
CNY056	AZ10-509-1-B	25° 45.559 37° 41.196	Bege com esporos brancos	½ A1P1	--
CNY79	AZ10-02-C	25° 07.887 37° 05.044	Amarelo	A1P1	--
CNY90	AZ10-365-A	25° 24.041 37° 41.137	Bege com esporos brancos	TMP1	--
CNY091	AZ10-366-A	25° 50.407 37° 41.196	Bege amarelado com esporos brancos	TMP1	--
CNY92	AZ10-502-B	25° 50.407 37° 41.196	Castanho claro com esporos cinzentos	TMP1	--
CNY93	AZ10-504-B	25° 51.372 37° 54.546	Bege com esporos amarelos e cinzentos	A1P1	--
CNY94	AZ10-504-C	25° 51.372	Castanho claro com	A1P1	--

		37 54.546	esporos brancos		
CNY126	AZ10-373-A	25°20.484N 37°40.495W	Bege com esporos cinzentos	TM+cyc	1396,8
CNY127	AZ10-450-1-E	25°41.005N 37°43.005W	Vermelho com esporos cinzentos	½ A1P4	4,9
CNY130	AZ10-504-1- F-2	25°51.372N 37°54.546W	Castanho com esporos brancos e cinzentos	SWA	29,6
CNY132	AZ10-506-1- A-1	25°45.875N 37°51.419W	Bege com esporos brancos	½ A1P4	332.2
CNY133	AZ10-509-A	25°45.559 37°41.196	Vermelho escuro com esporos brancos	A1P1	--
CNY143	AZ10-09-A	25°59.597N 37°55.363W	Laranja com esporos castanhos	A1P2	45,6
CNY167	AZ10-438-B	25°24.277N 37°39.403W	Castanho claro com esporos beges	A1P1	811,1
CNX872	AZ10-03-2-A	25°05.567N 37°06.281W	Bege com esporos cinzentos e brancos	½ A1P2	2659,1
CNX873	AZ10-447-1-E	25°41.005N 37°43.005W	Castanho com esporos bege	SWAP4	883,0
CNX874	AZ10-450-1-A	25°41.005N 37°43.005W	Vermelho com esporos cinzentos fofos	½ A1P4	18,4
CNX876	AZ10-509-1-A	25°45.559N 37°55.348W	Bege com esporos cinzentos e brancos	½ A1P4	--
CNX917	AZ10-07-A	25°00.525 37°00.700	Castanho claro com esporos brancos	½ A1	--
CNX918	AZ10-511-1-A	25°45.559 37°41.150	Laranja brilhante com esporos pretos	½ A1P4	--
CNX938	AZ10-502-1-F	25°50.407N 37°55.348W	Laranja brilhante com esporos pretos	SWAP4	--
CNX949	AZ10-509-1-K	25°45.559 37°55.348	Laranja com esporos castanhos	SWAP4	--
CNX963	AZ10-3-1-A	25°05.567 37°06.281	Laranja brilhante com esporos pretos	½ A1P1	--
CNX964	AZ10-513-1-D	25°45.559 37°41.150	Laranja brilhante com esporos pretos	SWAP4	--
CNX967	AZ10-453-1-E	25°41.005 37°43.005	Laranja com esporos castanhos	SWAP4	--
CNX986	AZ10-501-3-B	25°50.407 37°55.348	Laranja com esporos brancos	½ A1P4	--
CNX988	AZ10-510-1-E	25°45.559 37°41.196	Rosa pálido com esporos brancos e colónias verde no meio	SWAP4	--

-- Extractos químicos não obtidos

**Anexo 2** Valores da concentração inibitória ( $\mu\text{g/mL}$ ) capaz de inibir 50% das linhas celulares cancerígenas para as amostras avaliadas

<b>Código da estirpe</b>	<b>Nome da Amostra</b>	<b>Meio de isolamento</b>	<b>IC50 (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>
PTA001A	AZ10-322-A	A1P2	do not change cell viability
PTA002A	AZ10-439-A-1	A1P1	do not change cell viability
PTA003A	SS11-004-G	A1P2	MTS assay is thought inadequate
PTA003B	SS11-004-G	A1P2	MTS assay is thought inadequate
PTA004A	PS11-004-A	A1P2	do not change cell viability
PTA004B	PS11-004-A	A1P2	4,25
PTA005A	SS11-003-C-1	A1P2	1,33
PTA005B	SS11-003-C-1	A1P2	do not change cell viability
PTA006A	SS11-001-E-1	A1P2	do not change cell viability
PTA006B	SS11-001-E-1	A1P2	do not change cell viability
PTA007A	SS11-0003-G	A1P1	do not change cell viability
PTA007B	SS11-0003-G	A1P1	39,070
PTA008A	SS11-004-F-1-A	A1P2	do not change cell viability
PTA008B	SS11-004-F-1-A	A1P2	7,05
PTA009A	SM11-002-A-1	A1P1	do not change cell viability
PTA010A	AZ10-202-A	$\frac{1}{2}$ A1P1	1,89
PTA011A	SM11-001-B-1	$\frac{1}{2}$ A1P2	do not change cell viability
PTA011B	SM11-001-B-1	$\frac{1}{2}$ A1P2	do not change cell viability
PTA012A	AZ10-322-A-1	$\frac{1}{2}$ A1P1	do not change cell viability
PTA013	AZ10-333-B	$\frac{1}{2}$ A1P1	18,82
PTA014A	AZ10-496-A-1	SWAP1	do not change cell viability
PTA015A	SM11-001-B-3-A	$\frac{1}{2}$ A1P2	do not change cell viability
PTA015B	SM11-001-B-3-A	$\frac{1}{2}$ A1P2	do not change cell viability
PTA016A	SM11-003-A-1	$\frac{1}{2}$ A1P2	do not change cell viability
PTA016B	SM11-003-A-1	$\frac{1}{2}$ A1P2	5,46
PTA017A	AZ10-352-A-1-B	$\frac{1}{2}$ A1P1	MTS assay is thought inadequate
PTA18A	SM11-001-A-1	$\frac{1}{2}$ A1P2	6,51
PTA019A	AZ10-202-A	$\frac{1}{2}$ A1P1	2,44
PTA020A	AZ10-202-B-1	$\frac{1}{2}$ A1P1	do not change cell viability
PTA021A	SS11-03-D-2-A	A1P2	do not change cell viability
PTA021B	SS11-03-D-2-A	A1P2	do not change cell viability

PTA022A	AZ10-333-A	½ A1P1	MTS assay is thought inadequate
PTA023A	SS11-003-F-1-A	A1P2	do not change cell viability
PTA023B	SS11-003-F-1-A	A1P2	do not change cell viability
PTA024A	SS11-004-G-1-C	A1P2	MTS assay is thought inadequate
PTA024B	SS11-004-G-1-C	A1P2	MTS assay is thought inadequate
PTA025A	SM11-002-A-1-A-2	½ A1P2	do not change cell viability
PTA026A	SS11-003-I-A	A1P2	31,99
PTA026B	SS11-003-I-A	A1P2	do not change cell viability
PTA027A	AZ10-202-A	SWAP2	3,38
PTA028A	SM11-003-I-1	A1P2	16,61
PTA028B	SM11-003-I-1	A1P2	do not change cell viability
PTA029A	SS11-003-C-1-B	A1P2	do not change cell viability
PTA030A	SS11-004-C-1	M1P2	do not change cell viability
CNY-126	AZ10-373-A	TMP1	do not change cell viability
CNY-127	AZ10-504-1-F-2	½ A1P4	23,84
CNY-143	AZ10-09-A	A1P2	do not change cell viability
CNY-167	AZ10-438-B	A1P1	do not change cell viability
CNX-872	AZ10-03-2-A	½ A1P2	do not change cell viability
CNX-874	AZ10-450-1-A	½ A1P4	20,13

**Anexo 3** Valores de MIC calculados para MRSA e VRE de cada amostra testada

<b>Código estirpe</b>	<b>Nome da amostra</b>	<b>Meio isolamento sólido</b>	<b>MIC (µg/µL) MRSA</b>	<b>MIC (µg/µL) VRE</b>
PTA-001A	AZ10-322-A	A1P2	MRSA <0.25	VRE <0.25
PTA-001B	AZ10-322-A	A1P2	do not change cell viability	do not change cell viability
PTA-002A	AZ10-439-A-1	A1P1	do not change cell viability	do not change cell viability
PTA-002B	AZ10-439-A-1	A1P1	do not change cell viability	do not change cell viability
PTA-003A	SS11-004-G	A1P2	do not change cell viability	do not change cell viability
PTA-003B	SS11-004-G	A1P2	--	--
PTA-004A	PS11-004-A	A1P2	do not change cell viability	do not change cell viability
PTA-004B	PS11-004-A	A1P2	do not change	do not change

			cell viability	cell viability
PTA-005A	SS11-003-C-1	A1P2	MRSA < 7,8x10 <sup>-3</sup>	VRE<0,0156
PTA-005B	SS11-003-C-1	A1P2	do not change cell viability	do not change cell viability
PTA-006A	SS11-001-E-1-A	A1P2	do not change cell viability	do not change cell viability
PTA-006B	SS11-001-E-1-A	A1P2	do not change cell viability	do not change cell viability
PTA-007A	SS11-003-G-1	A1P1	do not change cell viability	do not change cell viability
PTA-007B	SS11-003-G-1	A1P1	do not change cell viability	do not change cell viability
PTA-008A	SS11-004-F-1-A-1	A1P2	do not change cell viability	do not change cell viability
PTA-008B	SS11-004-F-1-A-1	A1P2	--	--
PTA-009A	SM11-002-A-1	A1P1	do not change cell viability	do not change cell viability
PTA-009B	SM11-002-A-1	A1P2	do not change cell viability	do not change cell viability
PTA-010A	AZ10-202-A	½ A1P1	do not change cell viability	do not change cell viability
PTA-010B	AZ10-202-A	½ A1P1	--	--
PTA-011A	SM11-001-B-1	½ A1P2	do not change cell viability	do not change cell viability
PTA-011B	SM11-001-B-1	½ A1P2	do not change cell viability	do not change cell viability
PTA-012A	AZ10-322-A-1	½ A1P1	do not change cell viability	do not change cell viability
PTA-013A	AZ10-333-B	½ A1P1	do not change cell viability	do not change cell viability
PTA-013B	AZ10-333-B	½ A1P1	--	--
PTA-014A	AZ10-496-A-1	SWAP1	do not change cell viability	do not change cell viability
PTA-015A	SM11-001-B-3-A	½ A1P2	do not change cell viability	do not change cell viability
PTA-015B	SM11-001-B-3-A	½ A1P2	do not change cell viability	do not change cell viability
PTA-016A	SM11-003-A-1	½ A1P2	do not change cell viability	do not change cell viability
PTA-016B	SM11-003-A-1	½ A1P2	do not change cell viability	do not change cell viability
PTA-017A	AZ10-352-A-1-B	½ A1P1	MRSA < 0.125	VRE < 0.125
PTA-018A	SM11-001-A-1	½ A1P2	do not change cell viability	do not change cell viability
PTA-018B	SM11-001-A-1	½ A1P2	do not change cell viability	do not change cell viability
PTA-019A	AZ10-202-A	A1P2	do not change cell viability	do not change cell viability
PTA-020A	AZ10-202-B-1	½ A1P1		

			MRSA < 0.125	VRE < 0,063
PTA-021A	SS11-03-D-2-A	A1P2	MRSA < 0.25	VRE < 0.25
PTA-021B	SS11-03-D-2-A	A1P2	do not change cell viability	do not change cell viability
PTA-022A	AZ10-333-A	½ A1P1	do not change cell viability	do not change cell viability
PTA-023A	SS11-003-F-1-A	A1P2	do not change cell viability	do not change cell viability
PTA-023B	SS11-003-F-1-A	A1P2	do not change cell viability	do not change cell viability
PTA-024A	SS11-004-G-1-C	A1P2	do not change cell viability	do not change cell viability
PTA-024B	SS11-004-G-1-C	A1P2	do not change cell viability	do not change cell viability
PTA-025	SM11-002-A-1-A-2	½ A1P2	do not change cell viability	do not change cell viability
PTA-026A	SS11-003-I-A	A1P2	MRSA < 0.25	VRE < 0.25
PTA-026B	SS11-003-I-A	A1P2	do not change cell viability	do not change cell viability
PTA-027A	AZ10-202-A	SWAP2	do not change cell viability	do not change cell viability
PTA-028A	SM11-003-I-1	A1P2	do not change cell viability	do not change cell viability
PTA-028B	SM11-003-I-1	A1P2	do not change cell viability	do not change cell viability
PTA-029A	SS11-003-C-1-B	A1P2	do not change cell viability	do not change cell viability
PTA-029B	SS11-003-C-1-B	A1P2	do not change cell viability	do not change cell viability
PTA-030A	SS11-004-C-1	M1P2	do not change cell viability	do not change cell viability
PTA-030B	SS11-004-C-1	M1P2	do not change cell viability	do not change cell viability
PTA-031A	AZ10-333-B-1	M1P2	MRSA < 0.031	VRE < 7,8x10 <sup>-3</sup>
PTA-031B	AZ10-333-B-1	M1P2	MRSA < 7,8x10 <sup>-3</sup>	VRE < 7,8x10 <sup>-3</sup>
PTA-032A	AZ10-333-D-2-A-1	½ A1P1	MRSA < 0.125	VRE < 0,016
PTA-032B	AZ10-333D-2-A-1	½ A1P1	do not change cell viability	do not change cell viability
PTA-033A	SS11-005-C	A1P2	do not change cell viability	do not change cell viability

PTA-033B	SS11-005-C	A1P2	do not change cell viability	do not change cell viability
PTA-034A	SM11-003-A	SWAP2	MRSA < 7,8x10 <sup>-3</sup>	VRE < 7,8x10 <sup>-3</sup>
PTA-034B	SM11-003-A	SWAP2	do not change cell viability	do not change cell viability
PTA-035A	FC11-003-D-1	A1P1	do not change cell viability	do not change cell viability
PTA-035B	FC11-003-D-1	A1P1	do not change cell viability	do not change cell viability
PTA-036A	FG11-001-A-1	SWAP2	do not change cell viability	do not change cell viability
PTA-036B	FG11-001-A-1	SWAP2	do not change cell viability	do not change cell viability
CNY056	AZ10-509-1-B	½ A1	--	--
CNY79	AZ10-02-C	A1P1	--	--
CNY90	AZ10-365-A	TM	--	--
CNY091	AZ10-366-A	TM	--	--
CNY92	AZ10-502-B	TM	--	--
CNY93	AZ10-504-B	A1P1	--	--
CNY94	AZ10-504-C	A1P1	--	--
CNY126	AZ10-373-A	TM	do not change cell viability	do not change cell viability
CNY127	AZ10-450-1-E	½ A1P4	--	VRE 0.25
CNY130	AZ10-504-1-F-2	SWAP1	MRSA < 0.031	VRE < 0.031
CNY132	AZ10-506-1-A-1	½ A1P4	do not change cell viability	do not change cell viability
CNY133	AZ10-509-A	A1P1	--	--
CNY143	AZ10-09-A	A1P2	do not change cell viability	do not change cell viability
CNY167	AZ10-438-B	A1P1	do not change cell viability	do not change cell viability
CNX872	AZ10-03-2-A	½ A1P2	do not change cell viability	do not change cell viability
CNX873	AZ10-447-1-E	SWAP4	do not change cell viability	do not change cell viability
CNX874	AZ10-450-1-A	½ A1P4		VRE 0.25
CNX876	AZ10-509-1-A	½ A1P4	do not change cell viability	do not change cell viability
CNX917	AZ10-07-A	½ A1	--	--
CNX918	AZ10-511-1-A	½ A1P4	--	--

CNX938	AZ10-502-1-F	SWAP4	--	--
CNX949	AZ10-509-1-K	SWAP4	--	--
CNX963	AZ10-3-1-A	½ A1P1	--	--
CNX964	AZ10-513-1-D	SWAP4	--	--
CNX967	AZ10-453-1-E	SWAP4	--	--
CNX986	AZ10-501-3-B	½ A1P4	--	--
CNX988	AZ10-510-1-E	SWAP4	--	--

-- Valores não calculados