



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

ELTHON GOIS FERREIRA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DE ALCALÓIDES GUANIDÍNICOS
ISOLADOS DA ESPONJA *Monanchora arbuscula* (Duchassaing & Michelotti, 1864)
COLETADA NO PARQUE ESTADUAL MARINHO PEDRA DA RISCA DO MEIO –
CE.**

**FORTALEZA
2010**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DE ALCALÓIDES GUANIDÍNICOS ISOLADOS DA
ESPONJA *Monanchora arbuscula* (Duchassaing & Michelotti, 1864) COLETADA NO PARQUE
ESTADUAL MARINHO PEDRA DA RISCA DO MEIO – CE.**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Marinhas Tropicais.

Área de concentração:

Prospecção de compostos marinhos com atividade biológica.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Letícia Veras Costa Lotufo

ELTHON GOIS FERREIRA

**AValiação DO POTENCIAL CITOTÓXICO DE ALCALÓIDES GUANIDÍNICOS ISOLADOS DA
ESPONJA *Monanchora arbuscula* (Duchassaing & Michelotti, 1864) COLETADA NO PARQUE
ESTADUAL MARINHO PEDRA DA RISCA DO MEIO – CE.**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Marinhas Tropicais. Área de concentração Prospecção de compostos marinhos com atividade biológica.

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Manuel Antônio Andrade Furtado Neto, PhD
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof^a. Dr^a. Vânia Maria Maciel Melo
Departamento de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof^a. Dr^a. Raquel Carvalho Montenegro
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Universidade Federal do Ceará - UFC

A minha avó por ser um exemplo de perseverança, aos meus pais e amigos que me proporcionaram sempre estar aprendendo o significado sobre o que é viver.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a **Deus** pelo dom da vida, pelos familiares e amigos proporcionados e por sempre me guiar de maneira digna pelos caminhos da vida.

A **Prof^a. Dr^a. Letícia Veras Costa Lotufo** primeiramente por ter aceitado me orientar, pela amizade, preocupação, carisma, apoio incondicional, pelo exemplo de pessoa e profissional a ser seguido, pelos ensinamentos passados durante esses anos trabalhando na pesquisa e por muitos outros fatores dos quais não consigo nomear.

A **Prof^a. Dr^a. Cláudia Pessoa** por ter permitido a minha entrada no laboratório, pelo apoio dado a realização deste trabalho e por proporcionar ao laboratório momentos de descontração permitindo assim um melhor entrosamento entre os integrantes do laboratório.

Ao **Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes** por permitir o desenvolvimento deste trabalho no Laboratório de Oncologia Experimental e pela dedicação a proporcionar melhores condições ao laboratório para realização do trabalho.

A **Dr^a. Raquel Montenegro** pela constante ajuda para realização deste trabalho, sua imensa disposição em ensinar, pelas sugestões, amizade, convívio e apoio.

A **Dr^a. Paula Christine Jimenez** por toda amizade, disponibilidade a me ajudar, pelas excelentes conversas e momentos de descontração, pelos ensinamentos acadêmicos e de vida, pelos conselhos dados e pelos muitos sambas os quais tive prazer em dividir o salão.

Ao professores **Dr. Edilberto Silveira Rocha** por ter cedido o laboratório para realização da parte química deste trabalho, pelos ensinamentos e broncas dadas durante a realização do trabalho.

A professora **Dr^a. Otília Deusdênia Loiola Pessoa**, por ter acreditado nos produtos naturais marinhos e permitido que este trabalho fosse realizado sob sua co-orientação, pelo carisma e alegria.

A **Julieta Rangel de Oliveira** pela ajuda de maneira decisiva na realização deste trabalho na parte da química, pela amizade, pelo aprendizado e histórias engraçadas compartilhadas.

Ao **Dr. Eduardo Hajdu** (Museu Nacional de Poríferos, UFRJ) pela participação na coleta e identificação da espécie utilizada neste trabalho.

Aos alunos **Eduardo Esteves** e **Sula Salani** (Museu Nacional de Poríferos, UFRJ) pela disposição, sempre que necessária, para esclarecer algumas dúvidas, pela constante ajuda com informações sobre a espécie e pela identificação da mesma.

Ao Amigo e agora **Dr. Diego Veras Wilke** pela grande ajuda no meu início nos produtos naturais marinhos, pela confiança, pelas conversas, conselhos e por todos os ensinamentos passados.

Ao **Dr. Tito Monteiro da Cruz Lotufo** pela ajuda na coleta do material, por seu empenho na disciplina de biologia aquática II, por ter me guiado ao trabalho com produtos naturais marinhos, pela oportunidade dada para lecionar sua disciplina como estágio em Ciências marinhas e pelos vastos ensinamentos passados.

A professora **Dr^a. Vânia Melo** por todos os conselhos dados para a melhoria do trabalho, pela disponibilidade sempre que preciso para ajudar e pela vaga a mim concedida no curso de ecologia microbiana.

Ao professor **Dr. Manuel Furtado** por mais uma vez ter aceitado participar de uma avaliação minha, sendo esta de cunho muito importante para minha vida acadêmica, por todos os momentos de descontração promovidos e pelos conhecimentos passados durante a minha fase de graduação.

A **Silvana França** pelos vários momentos de descontração proporcionados no laboratório, por toda sua paciência comigo, pela amizade e pelo admirável trabalho realizado no laboratório.

Aos funcionários do LOE, **Erivanda França, Sheyla Prado e Adelânia** pela dedicação, pela prestatividade e o excelente trabalho desenvolvido.

A **Marne Vasconcelos** pelos momentos de descontração proporcionados, que atualmente estão fazendo falta, amizade e conselhos.

As meninas do laboratório de ecotoxicologia, **Isabelle Arthaud, Janaina Bernado, Janisi Aragão, Jeamylyle Nilin, Josy Siebra, Livia Pitombeira, Marcela Davanso (Tchuca) e Marcionília Pimentel** pela receptividade, pelos conselhos e dicas para esse trabalho e pelo convívio harmonioso durante esse período.

Aos meus amigos do LOE, **José Roberto, Arinice Costa, Cecília Carvalho, Krsitiana Mousinho, Kézia Lacerda, Ana Jérnia, Delano Marinho, Aline, Eveline Alves, Gabriela Cunha, Francisco Washington, Miller, Assuero, Rafael Sucupira, Vanessa Canamary, Hindeburgo, Paula IC, Dayse Jereissate**, pela convivência no dia a dia, amizade, momentos de descontração no laboratório, cumplicidade e aprendizado.

Em especial aos meus amigos do LOE **Bruno Cavalcanti, Danilo Rocha, Hemerson Iury, Felipe Rocha, Igor Cabral, Patrícia Marçal e Paulo Michel** por toda a força dada durante esses anos, companheirismo, pela ajuda sempre que necessária, conselhos, broncas e o mais importante à amizade.

Ao **Paulo, Dona Rogéria e Dona Fátima** por sempre estarem trabalhando pela manutenção do laboratório, cuidando do material necessário e pela pronta ajuda quando precisa.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Instituto de Ciências do Mar e UNIFAC por sempre estarem trabalhando para dar condições para que este trabalho se realizasse.

As minhas amigas, **Gardênia Militão, Adriana Carvalho e Ivana Dantas**, pois são pessoas as quais eu tenho muita consideração e afeto, pelas várias noites de bohemia, além de vários momentos de descontração durante os churrascos e feijoadas da vida, pela amizade incondicional e muitas histórias para contar.

Aos amigos, **Igor Correira, Felipe Schmitt, Álisson Canafistula, Marquim, Clayton Vidal** por terem me proporcionado muitas farras com bastantes momentos de alegria neste ano que passou, pela amizade, pelos conselhos, pela força naqueles momentos difíceis e momentos de descontração durante nossos churrascos e feijoadas.

As minhas amigas **Carla Sombra, Marisa Sombra, Paula Sombra e Raquel Santiago** sem distinção são pessoas as quais eu tenho muito a agradecer, pelo carinho, conselhos, momentos de divertimento, muitas histórias, pois são pessoas ímpares que a cada dia que passa me cativam.

Aos meus amigos **Ghislain Favé, Gabriel Castro e João Paulo Cavalcante** pela amizade, companheirismo e momentos de muito divertimento.

Ao meu amigo **Ronaldo Igor** pela pessoa alegre, que sempre está me dando forças nos momentos difíceis, pelo companheirismo, pela amizade incondicional, prestatividade, incentivo e conselhos e por ser um exemplo de superação.

Aos meus amigos **Ricardo Albuquerque e Otávio Castro**, amigos de mestrado, por todos os conselhos dados, amizade absoluta, momentos de pura alegria e farras bastante descontraídas.

Ao meu mais que amigo, irmão, **José Fábio** por toda a força dada, incentivo, amizade indiscutível, carinho e por todos esses anos de convivência os quais nos fez amadurecer.

A minha mais que amiga, irmã, **Tereza Emanuelle** pela paciência comigo, conselhos, conversa, carinho, incentivo.

Aos meus eternos amigos **Francisco Jackson, Jackson Câmara, Elton Saraiva e Phillip Fernandes** pelo companheirismo, cumplicidade, apoio, conselhos, aprendizado.

Aos meus amigos de graduação **Aline Mendes, Bruno Átila, Darlyanne Gadelha, Douglas Pinheiro, Francisca Andréa, Giuseppe, Jonatas Bezerra, Leiliana Bezerra, Karoline Aguiar, José Fernandes, Nathalie Dias, Pedro Kolb, Rafael Rômulo, Thiago Vitor e Wander Godinho** por todos os anos de convivência, amizade, companheirismo, histórias de graduação e principalmente pelos momentos de descontração quando já não agüentava mais as aulas.

Aos meus amigos de mestrado, **Geórgia Barguil, Tallita Tavares, Leandro Fonseca, Ronaldo Ruy, Fernanda Rodrigues, Alvarenga** “*In memória*” e aos demais pelo convívio durante esse período, amizade, conversas e ajuda.

A minha avó materna que sempre esteve presente na minha educação, pelo exemplo de perseverança, carinho e coisas das quais não tenho palavras a agradecer.

Aos meus pais, que mesmo separados sempre estiveram unidos para me proporcionar uma boa educação, apoiando algumas de minhas decisões e proporcionando ser hoje a pessoa que sou.

A minha irmã, **Letícia Gois**, que apesar de todas as nossas brigas, amo esta pessoa incondicionalmente.

Aos meus tios **Regina Lúcia** e **Carlos Morais** pelo carinho, ajuda, conselhos, compreensão e incentivo.

A minhas primas **Priscila Karla** e **Patrícia Karla** por todo carinho, amor e afeto para com a minha pessoa.

A família Girão, meus vizinhos, por todo o carinho, confiança, bronca, amizade acima de tudo e apoio em momentos cruciais para minha vida, pois é para mim uma segunda família.

Aos demais familiares e amigos que sempre acreditaram em mim.

A CAPES pelo apoio ao desenvolvimento deste trabalho

“Fui um menino pequeno que, jogando na praia, encontrava de vez em quando um calhau mais fino ou uma concha mais bonita que o normal. O oceano da verdade se estendia, inexplorado, diante do meu.” *Isaac Newton*

POTENCIAL CITOTÓXICO DE ALCALÓIDES GUANIDÍNICOS ISOLADOS DA ESPONJA *Monanchora arbuscula* (Duchassaing & Michelotti, 1864) COLETADA NO PARQUE ESTADUAL MARINHO PEDRA DA RISCA DO MEIO – CE. Autor: Elthon Gois Ferreira. **Orientadora:** Dr^a. Letícia Veras Costa Lotufo. Dissertação de Mestrado. Instituto de Ciências do Mar – LABOMAR. Universidade Federal do Ceará. Janeiro, 2009.

Resumo

Os organismos marinhos têm sido destaque no tratamento de várias doenças. Alcalóides guanidínicos são comumente encontrados entre as esponjas da família Cambreidae e apresentaram uma ampla diversidade de atividades biológicas. O presente trabalho avaliou o potencial citotóxico dos alcalóides guanidínicos isolados da esponja marinha *Monanchora arbuscula* coletada no Parque Estadual Pedra da Risca do Meio e o mecanismo de ação envolvido na citotoxicidade observada em ptilocaulina. Cinco alcalóides guanidínicos foram isolados a partir do estrato hidroalcoólico: ptilocaulina (PT), 8b-hidroxiptilocaulina (8HPT), mirabilina B e a mistura de epímeros 1,8a;8b,3a-dideidro-8β-hidroxiptilocaulina e 1,8a;8b,3a-dideidro-8α-hidroxiptilocaulina. A atividade citotóxica dos compostos foi avaliada pelo método do MTT após 72 horas de incubação em linhagens tumorais humanas HL-60 (leucemia), MDA-MB-435 (melanoma), HCT-8 (côlon) e SF-295 (Gioblastoma), e em células mononucleadas de sangue periférico (PBMC) pelo método do Alamar Blue. O efeito de PT em células HL-60 foi avaliado após exposição por 24h a 10, 15 e 20 μM considerando diversos parâmetros e utilizando os seguintes ensaios: exclusão de azul de tripan (viabilidade celular); incorporação de BrdU (proliferação celular); coloração como BE/LA e May-Grunwald-Giemsa (morfologia celular). Técnicas de citometria de fluxp foram utilizadas para avaliar integridade de membrana, fragmentação do DNA, progressão do ciclo celular e despolarização da mitocôndria. A citotoxicidade de PT e 8HPT provou ser relevante para linhagens tumorais humanas, sobremaneira para melanoma (CI₅₀ 7,58-11,34μM) e leucemia (5,77-7,89μM), contudo não foram ativos em células normais (PBMC). A presença da hidroxila no carbono “8b” torna o composto 8HPT menos ativo que PT. O composto PT inibiu o número de células viáveis para todas as concentrações testadas, porém o aumento no número de células não viáveis foi afetado apenas pela maior concentração. Mais além, PT apresentou aumento nas células apoptóticas em todas as concentrações testadas e estes resultados foram reforçados pela condensação da cromatina e formação de blebs na membrana celular. Foi observado que o alcalóide induziu um ligeiro acréscimo no número de células concentradas na fase G1 do ciclo celular e aumentou a fragmentação de DNA para 22,29% e 22,97% para as concentrações de 20 e 15 μM, respectivamente. Além disso, o composto causou despolarização da mitocôndria, exceto na menor concentração testada. As evidências aqui arrecadadas sugerem que o composto PT causa induz apoptose às células HL-60 de modo concentração-dependente, ao mesmo tempo em que reforça a costa do Ceará como uma relevante fonte de moléculas com potencial biomédico.

Palavras-chave: Citotoxicidade. Apoptose. Alcalóides guanidínicos. Esponja marinha.

CYTOTOXIC POTENTIAL OF GUANIDINE ALKALOIDS ISOLATED FROM *Monanchora arbuscula* (Duchassaing & Michelotti, 1864) COLLECTED PEDRA DA RISCA DO MEIO MARINE STATE PARK - CE. Author: Elthon Gois Ferreira. **Advisor:** Dr. Letícia Veras Costa Lotufo. Master Dissertation. Instituto de Ciências do Mar – LABOMAR. Universidade Federal do Ceará. January, 2009.

Abstract

Marine organisms have been highlighted in the treatment of various diseases. Guanidine alkaloids are commonly found among the sponges of the Cambreidae family and have shown a wide range of biological activities. The present work evaluated the cytotoxic potential of guanidine alkaloids isolated from marine sponge *Monanchora arbuscula* collected at Pedra da Risca do Meio Marine State Park, Ceará, and the mechanism of action involved in the observed cytotoxicity of ptilocaulin. Five guanidine alkaloids were isolated from the hidroalcoholic extract: ptilocaulin (PT), 8b-hydroxyptilocaulin (8HPT), mirabilin B and an epimeres mixture of 1,8a;8b,3a-didehydro-8β-hydroxyptilocaulin and 1,8a;8b,3a-didehydro-8α-hydroxyptilocaulin. The cytotoxicity of the compounds was evaluated by the MTT method after 72 hours of incubation in human tumor lines HL-60 (leukaemia), MDA-MB-435 (breast), HCT-8 (Colon) and SF-295 (Giblastoma), and in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) by the method of the Alamar Blue. The effect of PT on HL-60 cells was evaluated after 24h treatment at 10, 15 and 20μM using microscopic observation of various parameters by the following assays: Trypan blue exclusion (cell viability); incorporation of BrdU (cell proliferation); May-Grunwald-Giemsa and acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) staining (cell morphology). Flow cytometry was used to further access cell membrane integrity, DNA fragmentation, cell cycle progression and depolarization of mitochondria. The cytotoxic potential of alkaloids PT and 8HPT proved to be significant towards human tumor lines, mostly for melanoma (IC₅₀ 7.58-11.34μM) and leukemia (5.77-7.89μM) lines, however not toxic to normal cells (PBMC). The presence of hydroxyl in carbon “8b” seems to underpower the bioactivity of compound 8HPT. PT reduced the count of viable cells at all concentrations tested on the Trypan blue assay, however increase in the number of non-viable cells was affected by only at the highest concentration. Moreover, PT induced an increase in apoptotic cells in the BE/AO assay and these results were reinforced by the observation of condensed chromatin and membrane blebbing. The alkaloid further caused a slight increase of cells at G1 phase of the cell cycle and an boosted the number of cells with fragmented DNA, with 22.29% and 22.97% at concentrations 20 and 15μM, respectively. Thus, the compound caused significant depolarization of mitochondria membrane, except in the lowest concentration. The evidences collected herein suggests that PT induces apoptosis in HL-60 cells in a concentration-dependent manner. Furthermore, these data support the coast of Ceará State as a prosperous source of compounds with biomedical relevance.

Key words: Cytotoxicity. Apoptosis. Guanidines alkaloids. Marine sponge.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Figura esquemática do mapa mundi destacando os oceanos. http://www.jornalismob.files.wordpress.com/2009/10/mapa_mundi_politico.jpg . -----	1
Figura 2	Estruturas químicas dos arabinucleosídeos isolados da esponja marinha <i>Cryptotethya crypta</i> . (a) Espongouridina, (b) Espongotimidina, (c) Vidarabina e (d) Citarabina. -----	4
Figura 3	Estrutura química da trabectedina (ET-743). -----	5
Figura 4	Estrutura química do peptídeo Prialt (ziconotídeo).-----	6
Figura 5	Estrutura química do mesilato de eribulina (E7389) derivada da halichondrina B.-----	6
Figura 6	Estrutura química dos depsipeptídeo Aplidina B e Dideminina B.-----	7
Figura 7	Estruturas químicas da dolastatina 10 e seus derivados: soblidotina, cemadotina e sintadotina.-----	8
Figura 8	Estrutura química da briostatina 1.-----	9
Figura 9	Desenho esquemático de uma esponja do tipo asconóide, evidenciando sua estrutura corpórea e alguns tipos celulares. Fonte: http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/filo-porifera/imagens/filo-porifera-61.jpg . -----	11
Figura 10	Estruturas químicas de alcalóides guanidínicos. -----	15
Figura 11	Número de revisões acerca de alcalóides guanidínicos de ocorrência natural, síntese, biossíntese, atividade biológica, química (incluindo síntese e desenvolvimento de grupos protetores) e síntese bioativa de guanidinas em química medicinal.-----	17

- Figura 12** Número de alcalóides guanidínicos que: (a) foram isolados; (b) tiveram sua via biossintética investigada ou; (c) foram sintetizados.----- 18
- Figura 13** Mapa do Parque Estadual Marinho Pedra da Risca do Meio - CE. Fonte: http://www.brasilmergulho.com.br/port/points/ce/images/mapa_gran.gif. --- 24
- Figura 14** Fotografia da espécie *Monanchora arbuscula*, registrada no Parque Estadual Marinho Pedra da Risca do Meio, Ceará, em julho de 2004. Por Eduardo Hajdu.----- 25
- Figura 15** Fluxograma da obtenção do extrato bruto de *Monanchora arbuscula* e respectivas partições líquido/líquido mostrando a obtenção das misturas e compostos puros das frações diclorometano e acetato de etíla. ----- 27
- Figura 16** Estrutura química dos alcalóides guanidínicos isolados da esponja marinha *M. arbuscula*. ----- 38
- Figura 17** Efeito do alcalóide PT nas concentrações de 10, 15 e 20 μM na viabilidade de células leucêmicas HL-60 determinado pelo ensaio Exclusão do Azul de Tripán após 24 horas de incubação. O controle negativo representa as células não tratadas. A Doxorrubicina (Dox) representa o controle positivo (0,55 μM). Os dados correspondem à média +- E.P.M. de experimentos independentes (N=3). * $p < 0,001$ comparado ao controle por ANOVA seguido por Student Newman-Keuls Test. ----- 42
- Figura 18** Efeito do alcalóide guanidínico PT nas concentrações de 10, 15 e 20 μM sobre a inibição da síntese de DNA avaliado pela incorporação do BrDU (BrDU positivo) avaliados na linhagem tumoral de células leucêmicas HL-60 após 24 horas de incubação. Contorle negativo (C-) representa as células não tratadas e Doxorrubicina (Dox) utilizado como controle positivo. Os dados correspondem à média +- E.P.M. de experimentos independentes (N=3). * $p < 0,001$ comparado ao controle por ANOVA seguido por Student Newman-Keuls Test. ----- 43
- Figura 19** Avaliação da atividade do composto PT nas concentrações de 10, 15 e 20 μM , sobre o padrão de morte celular em células leucêmicas HL-60 e

analisada por brometo de etídio/laranja de acridina após 24 horas de incubação. O controle negativo representa as células não tratadas e a doxorrubicina foi utilizada como controle positivo. Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de experimentos independentes (N=3). * $p < 0,001$ comparado ao controle por ANOVA seguido por Student Newman-Keuls Test. -----

44

Figura 20 Microfotografias das células HL-60 controle (A) e tratadas com doxorrubicina (B) e com o composto ptilocaulina nas concentrações de 10 μ M (C), 15 μ M (D) e 20 μ M (E) por 24 horas de incubação. Coloração por May-Grunwald-Giemsa – setas cavadas e tracejadas indicam fragmentação nuclear e condensação de cromatina, as cavadas cheias indicam desestabilização da membrana plasmática (presença de blebs), as pretas retas apontam as células com vacuolização citoplasmática e diminuição do volume celular e as setas cavadas e pontilhadas, as picnóticas. Aumento 400X. -----

45

Figura 21 Efeito do alcalóide guanidínico PT nas concentrações de 10, 15 e 20 μ M sobre a densidade celular de linhagem leucêmica (HL-60), analisado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação. C: controle negativo; D: Doxorrubicina (0,55 μ M) foi usada como controle positivo. Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. *, $p < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett. -----

46

Figura 22 Efeito do composto PT nas concentrações de 10, 15 e 20 μ M sobre a viabilidade (integridade de membrana) de células leucêmicas de HL-60, analisado por citometria de fluxo, após 24 horas de incubação. C: controle negativo; D: Doxorrubicina (0,55 μ M) foi usada como controle positivo. Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. *, $p < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett. -----

47

- Figura 23** Ação do composto PT sobre as fases do ciclo celular em células de linhagem leucêmica (HL-60), após 24 horas de incubação, analisadas por citometria de fluxo. C: controle negativo; D: Doxorubicina (0,55 μ M) foi usada como controle positivo. Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de três experimentes independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. *, $p < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett. ----- **48**
- Figura 24** Efeito do composto PT nas concentrações 10, 15, 20 μ M, após 24 horas de incubação, sobre a fragmentação de DNA de células de linhagem leucêmica (HL-60), analisado por citometria de fluxo. C: controle negativo representa as células não tratadas; D: Doxorubicina (Dox) (0,55 μ M) foi usada como controle positivo. Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de três experimentes independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. *, $p < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett. ----- **49**
- Figura 25** Efeito do alcalóide PT nas concentrações de 10, 15 e 20 μ M, após 24 horas de incubação, sobre o potencial transmembrânico mitocondrial de células de linhagem leucêmica (HL-60), analisado por citometria de fluxo utilizando rodamina 123. C: controle negativo; D: Doxorubicina (0,55 μ M) foi usada como controle positivo. Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de três experimentes independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. *, $p < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.----- **50**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Moléculas de diferentes classes químicas isoladas de esponjas marinhas com aplicação biomédica.-----	12
Tabela 2	Linhagens celulares tumorais utilizadas no ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> através do método do MTT.-----	30
Tabela 3	Atividade antiprolifertiva do extrato bruto e das frações obtidas, avaliadas pelo ensaio do MTT após 72hs de incubação em células tumorais. Os valores representam suas CI_{50} e $IC_{95\%}$ ($\mu\text{g/mL}$).-----	37
Tabela 4	Citotoxicidade em linhagens de células tumorais pelo ensaio do MTT, em células mononucleadas de sangue periférico (PBMC) – teste do ALAMAR BLUE – e potencial de dano em membrana em eritrócitos de camundongos pelos alcalóides guanidínicos e misturas obtidos de <i>M. arbuscula</i> .-----	40

LISTA DE SIMBOLOS E ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etila
BE	Brometo de etídeo
BrDU	5-bromo-2-deoxiuridina
CC	Coluna Cromatográfica
CCDC	Cromatografia de camada delgada comparativa
CE ₅₀	Concentração efetiva média
CI ₅₀	Concentração inibitória média
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
E.P	Éter de Petróleo
EHA	Extrato hidroalcoólico bruto
EPM	Erro padrão da média
EtOH	Álcool etílico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IC	Intervalo de confiança
LA	Laranja de acridina
MAAC	Fração acetato de etila
MADCM	Fração diclorometano
MeOH	Álcool metílico
MIC	Concentração inibitória mínima
NaCl	Cloreto de sódio
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazolina bromida
PBMC	Células mononucleadas de sangue periférico
PBS	Phosphate buffer solution (Tampão fosfato)
PEMPRM	Parque Estadual Marinho Pedra da Risca do Meio
RNM ¹ H	Ressonância Nuclear Magnética de Prótons
SE	Solução de Eritrócitos
SFB	Soro Fetal Bovino
US-NCI	United States National Cancer Institute (Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Mares e oceanos e a diversidade biológica	1
1.2. Produtos naturais marinhos	3
1.3. Filo Porifera	10
1.4. Importância das esponjas marinhas como fonte de produtos naturais	12
1.5. Família Crambeidae e gênero <i>Monanchora</i> como fonte de compostos bioativos	14
1.6. Importancia dos alcalóides guanidínicos marinhos	16
1.7. Relevância do trabalho	20
2. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivo geral	23
2.2. Objetivos específicos	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1. Coleta do material	24
3.2. Identificação da espécie	25
3.3. Obtenção/Isolamento dos compostos	26
3.4. Determinação da Atividade Citotóxica	28
3.4.1. Ensaio do MTT	28
3.4.2. Ensaio do Alamar Blue	29
3.4.3. Análise dos dados	30
3.5. Avaliação do dano à membrana plasmática – Teste Hemolítico	30
3.5.1. Análise dos dados	31
3.6. Estudos de Mecanismo de Ação	31
3.6.1. Viabilidade celular - Exclusão por Azul de Tripán	31
3.6.1.1. Análise dos dados	31
3.6.2. Inibição da síntese de DNA – Ensaio do BrdU	32
3.6.2.1. Análise dos dados	32
3.6.3. Coloração diferencial por BE/LA	32
3.7.3.1. Análise dos dados	33
3.6.4. Coloração por May-Grunwald-Giemsa	34
3.6.4.1. Análise dos dados	34
3.7. Citometria de fluxo	34
3.7.1. Determinação da Integridade de Membrana	34
3.7.1.1. Análise dos dados	35
3.7.2. Ciclo celular e fragmentação de DNA	35
3.7.2.1. Análise dos dados	36
3.7.3. Despolarização Mitocondrial	36
3.7.3.1. Análise dos dados	36
4. RESULTADOS	37
4.1. Compostos isolados	37
4.2. Atividade Citotóxica dos compostos	39
4.3. Avaliação quanto ao dano em membrana plasmática	39
4.4. Relação estrutura atividade	41
4.5. Determinação do mecanismo de ação	41
4.5.1. Avaliação da viabilidade celular por exclusão do azul de Tripán	41

4.5.2. Inibição da síntese de DNA – Ensaio do BrdU-----	42
4.5.3. Coloração diferencial por BE/LA-----	43
4.5.4. Análise de alterações morfológicas-----	44
4.5.5. Citometria de fluxo-----	46
4.5.5.1. Densidade celular-----	46
4.5.5.2. Integridade de membrana-----	47
4.5.5.3. Análise de ciclo celular-----	48
4.5.5.4. Análise de fragmentação do DNA-----	49
4.5.5.5. Avaliação do Potencial transmembrânico mitocondrial-----	50
5. DISCUSSÃO -----	51
6. CONCLUSÃO -----	59
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	60
ANEXO -----	69

1. INTRODUÇÃO

1.1. Os oceanos e a diversidade química e biológica

Os mares e oceanos compreendem a maior porção da esfera terrestre, com 362.000.000 km² de extensão, o que responde por 71% da superfície do planeta. Este ambiente abriga representantes de 34 dos 36 filos existentes, habitando praticamente toda a sua vasta área, desde as regiões rasas até as maiores profundidades, reunindo cerca de 300.000 espécies descritas entre plantas e invertebrados, sem contar os milhões de microorganismos (Donia & Hamann, 2003; Soares-Gomes & Figueiredo, 2009).

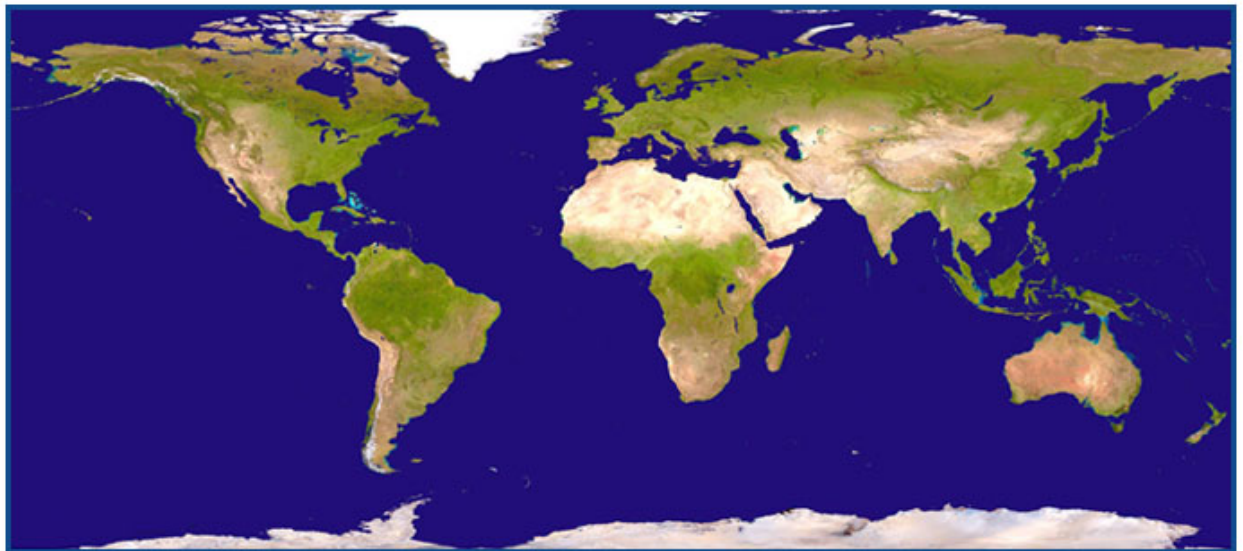


Figura 1 – Figura esquemática do mapa mundi destacando a abrangência dos oceanos no planeta Terra. http://www.jornalismob.files.wordpress.com/2009/10/mapa_mundi_politico.jpg.

Essa grande diversidade biológica acarreta, naturalmente, uma larga diversidade química. Embora o ambiente marinho siga as leis químicas fundamentais, existem fatores intrínsecos que podem ser apontados como causa para a essa diversidade química e biológica: a mistura complexa de sais; a enorme variedade de organismos vivos expelindo seus metabólitos ao meio e a imensa vastidão, além de uma média de profundidade de 4000 m. Num ambiente com tais características, a comunicação entre os organismos através de

substâncias químicas com alta solubilidade em água assume fundamental importância ecológica (Hester & Harrison, 2000; Bakuni & Kawat, 2005).

Os organismos vivos realizam suas funções biológicas através de reações químicas, sendo que o conjunto de processos que envolvem síntese e degradação química é chamado metabolismo. Os produtos do metabolismo primário são aqueles essenciais à sobrevivência dos seres vivos, diretamente envolvidos no cumprimento de suas funções vitais básicas. Os metabólitos secundários, por outro lado, são produzidos em vias derivadas do metabolismo primário, e abrangem as moléculas tidas, aparentemente, como assistenciais ao desenvolvimento do organismo hospedeiro. Vale ressaltar, enquanto a ocorrência de metabólitos primários tem caráter universal entre os seres vivos, a produção de metabólitos secundários é privilégio de um limitado grupo de organismos. Do mesmo modo, a ocorrência de um metabólito secundário particular é, na maioria das vezes, restrita a uma, se não, poucas, espécies. No ambiente marinho, costumeiramente, são algas, invertebrados e microorganismos que compõem o rol dos grupos que produzem ou armazenam esse tipo de moléculas. E, dentre as classes abastadas por metabólitos secundários, acredita-se numa correlação entre a diversidade de espécies e a diversidade química no que se refere, principalmente, à heterogeneidade estrutural das moléculas (Hester & Harrison, 2000; Mcclintock & Baker, 2001).

Uma vez que os metabólitos primários participam dos processos antigos, que permaneceram praticamente inalterados durante a evolução das espécies, os secundários estão ligados a reações menos conservadas que vieram se transformando ao longo do tempo, tornando-se mais complexas e derivando produtos ainda mais diversificados. São essas moléculas – como feromônios, pigmentos acessórios para proteção dos raios solares ou empregados para fins de comunicação, e, sobremaneira, substâncias de defesa química, seja para deter predadores ou a colonização por microorganismos patogênicos –, justamente, que estão envolvidos nos processos de adaptação dos indivíduos ao ambiente, sendo determinantes ao sucesso evolutivo de uma espécie e de fundamental importância para o aumento da biodiversidade (Pereira & Soares-Gomes, 2009; Hester & Harrison, 2000).

Os metabólitos secundários medeiam interações entre o hospedeiro e o ambiente ou entre outros organismos do ecossistema. Entretanto, apenas uma noção genérica das funções ecológicas destas moléculas é conhecida. Atualmente, é na empregabilidade desses produtos, seja como alimento, cosmético, inseticida e, principalmente, medicamento, onde se

concentra a maior parte dos estudos que se desenvolve com os metabolitos secundários de origem marinha (Pereira & Soares-Gomes, 2009).

Com relação aos compostos que encontraram aplicação nas ciências biomédicas, a hipótese vigente preza que estes possuam, de fato, relevância nas funções de defesa química dos organismos hospedeiros. Tanto, que foram em animais sésseis ou com restringida capacidade de locomoção, animais de corpo mole e carentes de estruturas físicas de defesa onde grande parte dessas moléculas foi encontrada. Nesse cenário, as esponjas, juntamente com ascídias, moluscos, briozoários, cnidários, algas e, mais recentemente, os microorganismos, destacam-se entre os grupos mais estudados no panorama dos produtos naturais marinhos (Burkhard, 2003; Donia & Hamann, 2003; Nagle *et al.*, 2004; Thakur & Müller, 2004; Costa-Lotufo *et al.*, 2009).

1.2. Produtos naturais marinhos

A busca por produtos marinhos com aplicação biomédica deriva da significância histórica das fontes terrestres, como plantas e microorganismos do solo, como fonte de medicamentos, ciência esta reconhecida desde a antiguidade e que segue vigorante até os dias atuais. Tanto que mais da metade dos compostos isolados e utilizados na terapêutica de doenças são provenientes de produtos naturais. A pesquisa por produtos naturais também é uma importante ferramenta para o conhecimento da constituição química das espécies, além de colaborar para o entendimento das relações ecológicas e taxonômicas dos seres vivos (Newman & Cragg, 2007).

Embora o difícil acesso às profundidades do ambiente marinho, nos últimos anos, tenha sido um grande obstáculo às pesquisas de prospecção de produtos naturais, observa-se um crescente interesse de exploração nessas áreas devido às inovações tecnológicas que permitem o acesso dos pesquisadores as regiões do ambiente marinho que até então não haviam sido exploradas. Contudo este ecossistema mostra-se uma fonte bastante promissora para prospecção de compostos com potencial farmacológico, visto que este ambiente apresenta uma gama de compostos com estruturas complexas, peculiares e mecanismos de ação inusitados provenientes principalmente de organismos invertebrados (Proksch *et al.*, 2002; Jimeno *et al.*, 2004; Fenical, W., 2006).

Os estudos com produtos naturais marinhos tiveram como marco inicial o trabalho realizado por Bergman e Feeney na década de 50 que demonstrou o isolamento da esponja marinha *Cryptotethya crypta* dois arabinucleosídeos, a espongouridina e espongotimidina (figura 2) que serviram de modelo para o desenvolvimento de uma nova classe de análogos – Ara-A (Vidarabina, Vidarabin Thilo[®]) e Ara-C (Citarabina, Alexan[®], Udacil[®]) (figura 2) utilizados atualmente na clínica para o tratamento de viroses e tumores malignos respectivamente (Bergman & Feeney, 1969; Proksch *et al.*, 2002).

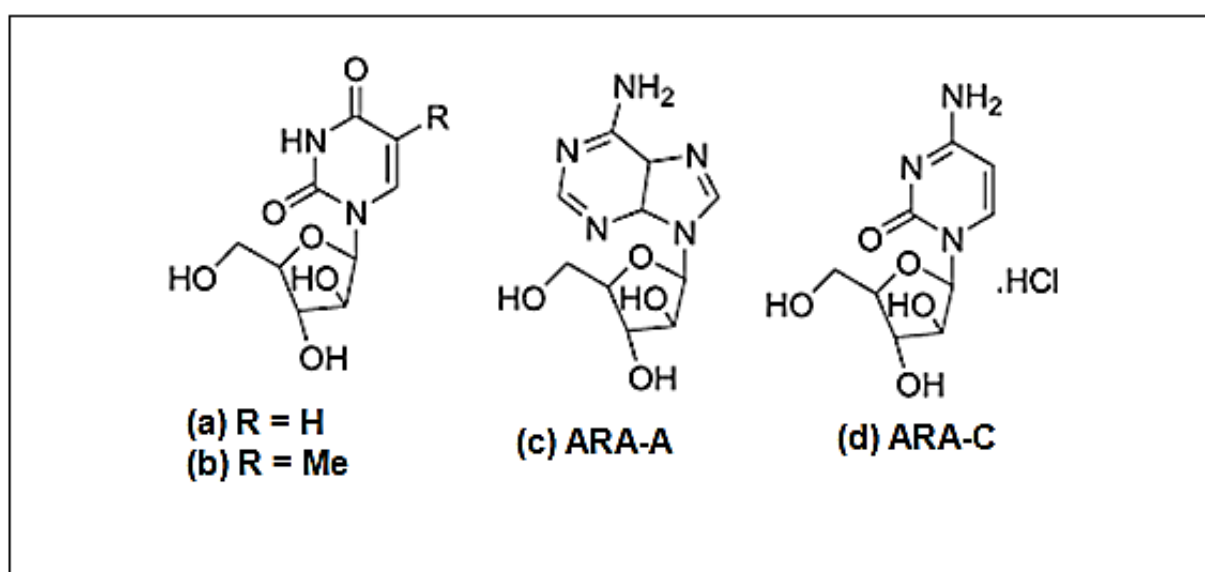


Figura 2 - Estruturas químicas dos compostos isolados da esponja marinha *Cryptotethya crypta*. (a) Espongouridina, (b) Espongotimidina, (c) Vidarabina e (d) Citarabina.

Desde o isolamento dos arabinonucleosídeos (1969) até o ano de 2006, cerca de 18.500 novos compostos foram isolados de organismos marinhos, representando uma fonte bastante promissora para prospecção de novos compostos, contudo vale ressaltar que menos de 3% do total estimado de organismos marinhos já tenha sido estudado. Além dos compostos vidarabina (Ara-A) e citarabina (Ara-C), atualmente o antitumoral, trabectedina (Yondelis[®]) e o analgésico neuropático ziconotídeo (Prialt[®]) encontram-se em uso clínico (Bergman & Feeney, 1969; EMA, 2009; ELAN, 2009).

O alcalóide trabectedina (Ecteinascidina-743, ET-743, Yondelis[®]) isolado da ascídia caribenha *Ecteinascidia turbinata* tem como peculiaridade o mecanismo de alquilação que difere da grande maioria dos outros agentes alquilantes. Este composto promove um

dobramento da fita de dupla hélice do DNA ao se ligar a guanidina em sequencias específicas de bases nas fendas menores da dupla hélice, causando desorganização do citoesqueleto, bloqueio da divisão celular e interferência no reconhecimento de fatores de transcrição ou proteínas ligantes ao DNA causando ativação ou a inibição de determinados genes. Este composto ingressou na clínica para o tratamento de sarcomas de tecido mole em setembro de 2007 e encontra-se em fase III para o tratamento de câncer de ovário e em fase II para o tratamento de tumores malignos de próstata e mama, osteossarcoma e tumores sólidos pediátricos (Newman & Cragg, 2004; 2006; Mayer e Gustafson, 2006; EMA, 2008).

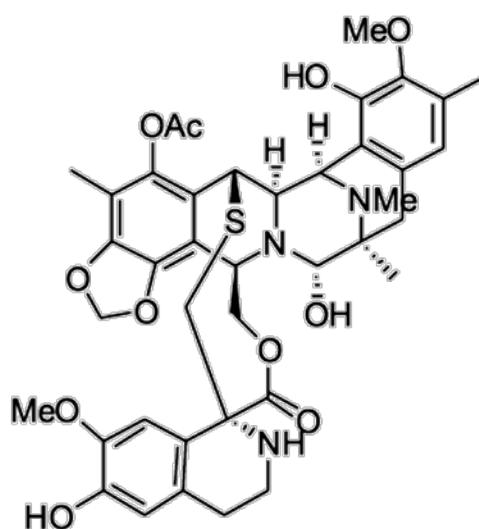


Figura 3 - Estrutura química da trabectedina (ET-743)

O analgésico neuropático Prialt[®] (ziconotídeo, ω -conotoxina MVIIA) é um peptídeo composto por 25 aminoácidos isolado do molusco *Conus magnus*, este tipo de composto bloqueia diversos subtipos de canais de cálcio. O potencial antinociceptivo do ziconotídeo é mil vezes mais potente que a morfina e o tratamento com este composto não gera dependência aos pacientes (Newman & Cragg, 2004; 2006; Mayer e Gustafson, 2006; ELAN, 2009; Costa-Lotufo *et al.*, 2009)

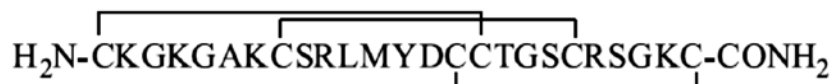


Figura 4 - Estrutura química do peptídeo Prialt (ziconotídeo).

Além desses quatro compostos isolados de animais marinhos utilizados atualmente na clínica outros compostos também encontram-se em estudos clínicos em fases bem avançadas. O mesilato de eribulina (E7389), por exemplo, é uma cetona macrocíclica derivada da halichondrina B isolada da esponja marinha *Halichondria okadai*. O mesilato de eribulina apresenta o mesmo mecanismo de ação da molécula a qual serviu de protótipo, inibindo a polimerização dos microtúbulos através da ligação com a tubulina. Este composto atualmente encontra-se em fase III para o tratamento de tumores malignos de mama, fase II para tumores de ovário, próstata, sarcoma, pulmão e pâncreas e em fase I para tumores sólidos (Newman & Cragg, 2004; 2006; Mayer e Gustafson, 2006; ELAN, 2009).

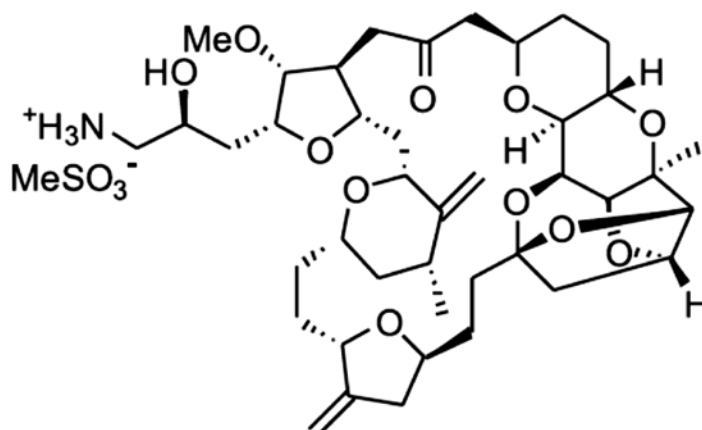


Figura 5 - Estrutura química do mesilato de eribulina (E7389) derivada da halichondrina B.

A aplidina é um depsipeptídeo isolado da ascídia *Aplidium albicans*, este composto apresenta uma grande semelhança estrutural com a didemnina B. A aplidina atualmente encontra-se em fase II para estudo em tumores malignos de mieloma múltiplo, leucemia linfóide aguda (LLA), linfoma periférico de células T e linfoma não-Hodgkin e em fase I para tumores sólidos e leucemias pediátricas. Este composto tem como mecanismo de ação a inibição da síntese de DNA e proteínas, levando ao bloqueio da divisão celular e a

diminuição do processo de angiogênese tumoral pela diminuição da liberação de fatores de crescimento (fator de crescimento vascular endotelial - VEGF), além de levar a morte celular por apoptose por diversas vias (Newman & Cragg, 2004; 2006; Mayer e Gustafson, 2006; Costa-Lotufo *et al.*, 2009).

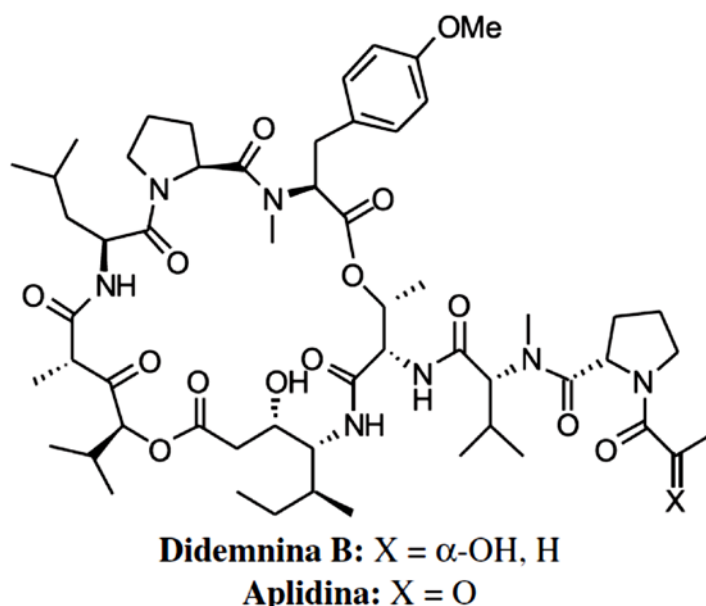


Figura 6 - Estrutura química dos depsipeptídeo Aplidina B e Dideminina B.

As dolastatinas, isoladas do molusco *Dolabella auricularia*, possuem potente atividade citotóxica e, dentre elas, a dolastatina 10 foi o peptídeo mais ativo isolado deste organismo, agindo sobre a inibição da polimerização da tubulina. Deste composto gerou-se três derivados sintéticos, soblidotina, cemadotina e sintadotina, que atualmente encontram-se em estudo clínicos. A soblidotina (TZT-1027) encontra-se em fase II para estudos em câncer de pulmão e sarcoma, enquanto que a cemadotina (LU-103793) por sua vez está em fase II para o tratamento de câncer de mama, melanoma e carcinoma de pulmão de células não pequenas, ambos os compostos citados estão em fase I de estudos para o tratamento de tumores sólidos. A sintadotina (ILX-651) encontra-se em fase II para o tratamento do câncer de próstata, melanoma e NSCLC. (Poncet, 1999; Rocha *et al.*, 2001; Newman & Cragg, 2004; 2006; Mayer e Gustafson, 2006; Costa-Lotufo *et al.*, 2009).

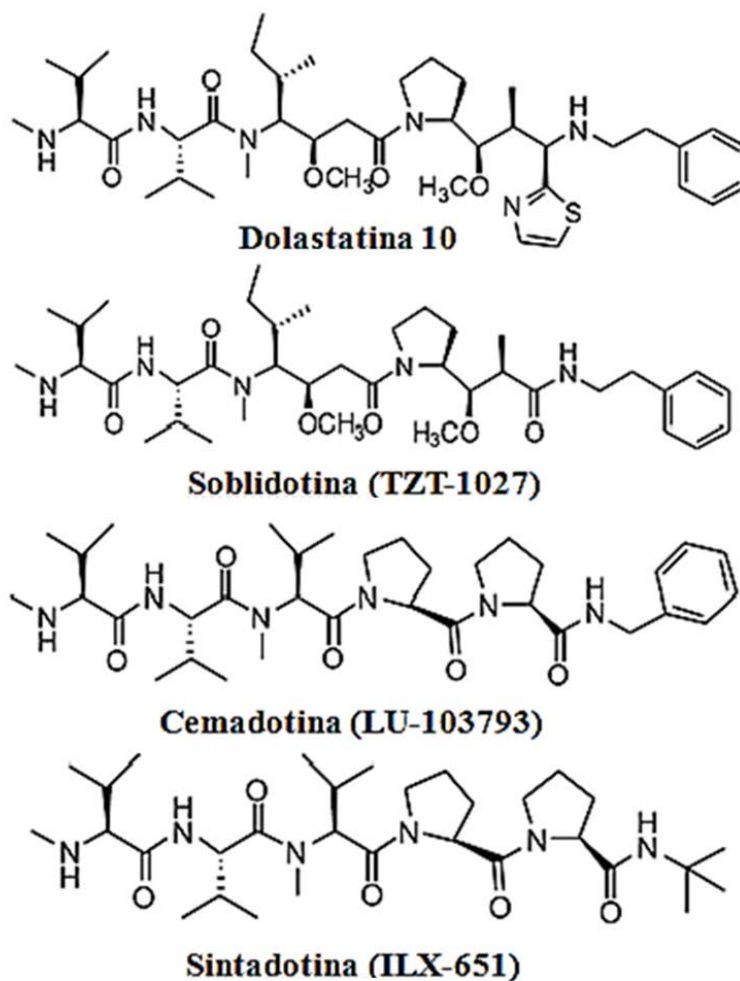


Figura 7 - Estruturas químicas da dolastatina 10 e seus derivados: soblidotina, cemadotina e sintadotina.

As briostatinas formam um grupo de lactonas macrocíclicas isoladas do briozoário *Bugula neritina*. A briostatina 1 tem como mecanismo de ação a modulação de proteínas quinase C e atuam em proteínas que contenham em sua estrutura o domínio C1. Atualmente este composto encontra-se em fase II de testes clínicos contra leucemias, linfomas, câncer do trato gastrointestinal, câncer de pâncreas, ovário, mama, próstata e cabeça e pescoço, além de estar em fase I para tumores de rim, esôfago e tumores sólidos (Rocha *et al.*, 2001; Costa-Lotufo *et al.*, 2009).

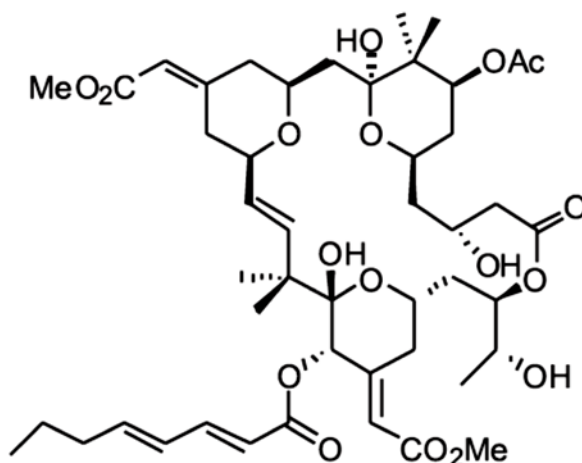


Figura 8 - Estrutura química da briostatina 1.

A busca por compostos com atividade citotóxica provenientes de invertebrados marinhos da costa do Ceará ainda é recente, porém já mostram resultados deveras promissores. Em 2003, Jimenez e colaboradores ao realizar um *screening* (triagem) para avaliar o potencial citotóxico do extrato hidroalcolico das 10 ascídias mais abundantes do litoral cearense, mostrou que seis das dez espécies estudadas mostraram-se fontes promissoras de compostos com atividade citotóxica. Recentemente, Jimenez (2009) isolou alcalóides inéditos, análogos das estaurosporinas, da ascídia *Eudistoma vanammei*, endêmica do Nordeste do Brasil, através de um fracionamento bioguiado. Estes compostos quando testados em células tumorais apresentaram atividade citotóxica da ordem de nanograma/mL, causando parada no ciclo celular destas células levando-as a morte por apoptose.

Ainda recentemente, Wilke e colaboradores (2009) realizaram um fracionamento bioguiado pela atividade citotóxica do extrato hidroalcolico do zoantídeo *Protopalythoa variabilis* coletado na costa cearense, onde isolaram α -aminoácidos lipídicos com potente atividade citotóxica em quatro linhagens tumorais testadas.

O potencial citotóxico das esponjas marinhas da costa cearense tem como destaque dois trabalhos realizados anteriormente por nosso grupo de pesquisa. O primeiro estudo foi realizado utilizando o extrato hidroalcolico de 8 espécies de esponjas mais abundantes encontradas na zona intertidal da praia de Flexeiras (Trairi), onde realizou-se um *screening* para avaliar o potencial citotóxico e antimicrobiano dos extratos obtidos. Dentre as oito espécies estudadas, sete apresentaram atividade em algum dos ensaios realizados. Um estudo publicado por Ferreira e colaboradores (2007) avaliou 22 extratos hidroalcolicos obtidos de esponjas marinhas coletadas do Parque Estadual Marinho Pedra da Risca do Meio

localizado na costa marinha do estado do Ceará através de um *screening* avaliando o potencial citotóxico e antimitótico. Dentre os extratos testados, vale ressaltar que nove apresentaram atividade citotóxica frente às linhagens de células tumorais e dezenove destes inibiram a divisão de ovos de ouriço-do-mar da espécie *Lytechinus variegatus*.

1.3. Filo Porifera

O filo Porífera é o grupo mais antigo dos metazoários existindo a aproximadamente 700 – 800 milhões de anos e são representados pelas esponjas. Estes organismos são multicelulares e apresentam uma organização corporea simples, sendo chamado de parazoários, devido à ausência de tecido verdadeiro e a presença de células totipotentes. Atualmente estima-se que existam em torno de 8.000 espécies de esponjas descritas e talvez exista o dobro de espécies ainda não descritas. A grande maioria das esponjas habita o ambiente marinho podendo ser encontradas também tanto em água doce quanto em águas salobras (Hickman, Roberts e Larson, 2003; Belarbi *et al.*, 2003; Thakur & Müller, 2004; Brusca & Brusca, 2006).

Estes organismos possuem o hábito de vida sésil e apresentam as mais variadas formas, dimensões e cores. Taxonomicamente o filo Porífera está dividido em três classes distintas pela natureza dos seus esqueletos internos: Calcarea, Hexactinellida e Demospongiae, sendo esta última classe a que apresenta o maior número de representantes vivendo atualmente (Hickman, Roberts e Larson, 2003).

A principal característica deste grupo é a presença de vários poros, denominados de óstios, revestindo a parte externa do seu corpo, esta característica deu origem ao nome Porífera (portador de poros). Estes poros abrem-se e levam a água absorvida pela esponja através de canais que servem de sistema de alimentação e filtração do animal. A complexidade do sistema aquífero, composto pelos canais, das esponjas permite classificá-las em três tipos diferentes, do mais simples ao mais complexo tem-se: asconóides, siconóides e leuconóides (Ruppert & Barnes, 1996; Hickman, Roberts e Larson, 2003).

O revestimento externo desses animais é feito por células achatadas denominadas de pinacócitos, que constituem a pinacoderme da esponja e são responsáveis pela fixação da esponja ao substrato. A superfície interna das esponjas denominada de coanoderme é formada

por células flageladas denominadas de coanócitos, responsáveis pelo transporte da água filtrada pelo animal e captação de alimento. Mergulhado em uma matriz proteica gelatinosa equivalente ao tecido conjuntivo dos metazóários denominada de mesoílo é possível encontrar as espículas, células com função esquelética responsável pela sustentação dos organismos, além disso, também é possível encontrar células amebóides denominadas de amebócitos, responsáveis pela digestão do animal (Figura 4) (Ruppert & Barnes, 1996; Hickman, Roberts e Larson, 2003).

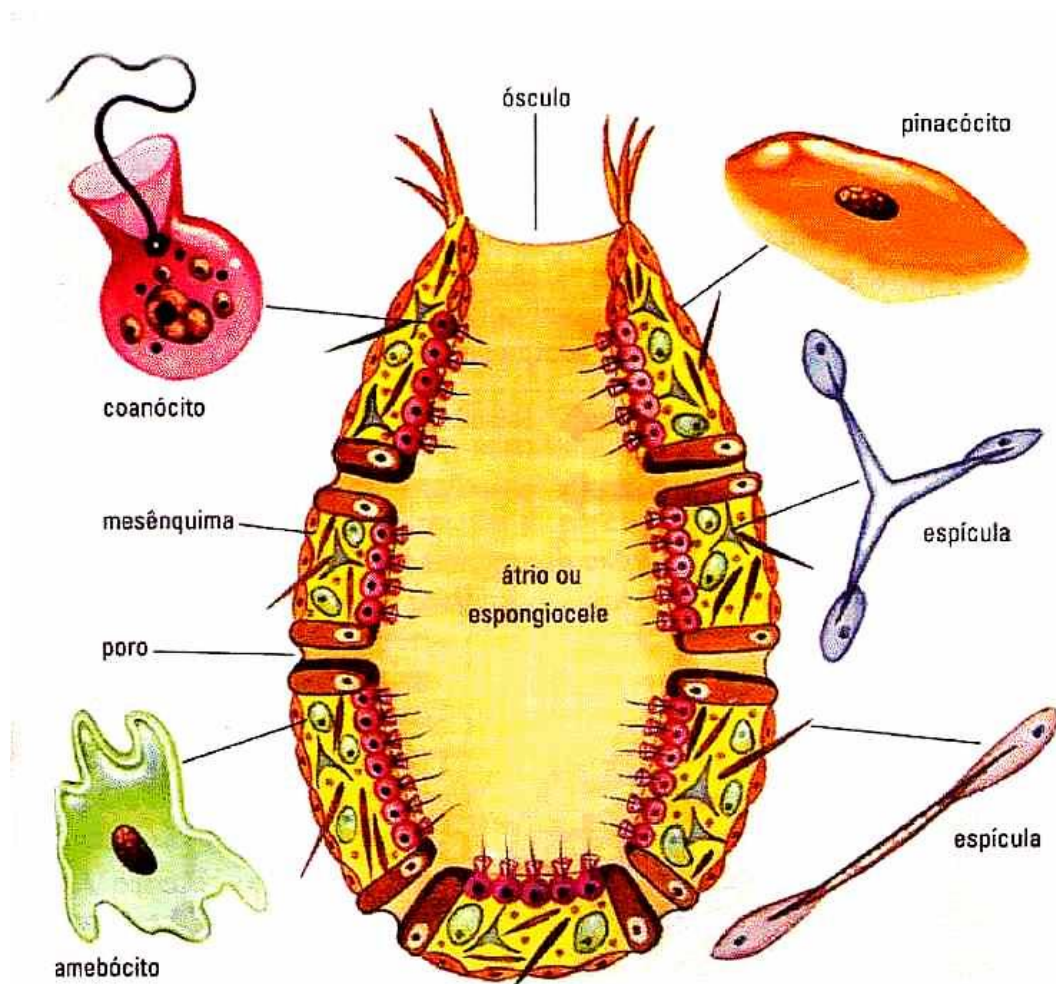


Figura 9 - Desenho esquemático de uma esponja do tipo asconóide, evidenciando sua estrutura corpórea e alguns tipos celulares. **Fonte:** <http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/filo-porifera/imagens/filo-porifera-61.jpg>.

1.4. Importância das esponjas marinhas como fonte de produtos naturais

A utilização das esponjas como ferramenta no tratamento de doenças é conhecida desde a antiguidade onde estes organismos, saturados com iodo, eram utilizados por médicos de Alexandria para induzir coagulação sanguínea ou com extratos vegetais bioativos para anestesiarem pacientes (Sipkema *et al.*, 2004).

As esponjas são uma excelente fonte de toxinas com variadas atividades biológicas que podem estar relacionadas a deter predadores, competição por espaço com outros organismos sésseis, a comunicação e proteção contra infecção, entretanto não está claro que servem efetivamente como defesa desses organismos, já que vários outros exemplos de defesa de esponjas foram reportados. Assim estes organismos destacam-se dos outros organismos marinhos por conter uma maior diversidade de metabólitos secundários e são consideradas promissoras fontes de composto com potencial medicinal, visto que a atividade citotóxica é encontrada em mais de 10% das espécies de esponjas já estudadas, além de serem vistas como potencialmente produtoras de agentes anti-incrustantes (*antifouling*) (Uriz *et al.* 1996; Becerro *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2003; Braekman & Dalozze, 2004).

As esponjas marinhas destacam-se como os principais detentores de compostos com atividade biológica apresentando uma grande diversidade de estruturas de carbono com mecanismos de ação inusitados, capazes de combater várias doenças, incluindo o câncer. Estes organismos são responsáveis por mais de 5.300 compostos descritos em diferentes classes químicas desde nucleosídeos, alcalóides, terpenos ativos, esteróis entre outros, podendo estes compostos servir de modelo para síntese de derivados e novas moléculas ainda mais potentes (Sipkema *et al.*, 2004).

As esponjas merecem ênfase por serem os principais detentores de compostos nitrogenados quando comparados aos outros filos que ocupam o ambiente marinho. Esses compostos são oriundos do metabolismo secundário e estão associados à atividade biológica, dentre elas merece destaque a atividade citotóxica (Urban *et al.*, 2000).

Tabela 1 - Moléculas de diferentes classes químicas isoladas de esponjas marinhas e suas respectivas aplicações.

COMPOSTO	ESPÉCIE	CLASSE QUÍMICA	MECANISMO DE AÇÃO	APLICAÇÃO
Aaptamina	<i>Aaptos suberitoides</i>	Alcalóide	Indução do gene p21 e parada no ciclo celular em G ₂ /M	Antitumoral
Agosterol A	<i>Spongia</i> sp.	Esteróide	Ativação de células NKT	Antitumoral
Halicondrina B	<i>Halichondria okadai</i>	Macrolídeo	Inibição da polimerização de tubulina	Antitumoral
Discodermolido	<i>Discodermia dissolute</i>	Lactona	Inibição da polimerização de tubulina	Antitumoral
Agelasphina (KRN7000)	<i>Agelas mauritianus</i>	Esteróide	Ativador de células NKT	Antitumoral
Monoalida	<i>Lufariella variabilis</i>	Sesterterpeno	Inibidor de phospholipase A ₂	Anti-inflamatório
Cacospongionolideo B	<i>Fasciospongia cavernosa</i>	Lactona Sesterterpeno	Inibidor de phospholipase A ₂	Anti-inflamatório
Variolina B B	<i>Kirkpatrickia varialosa</i>	Alcalóide	Antiviral	Anti-infecciosa
Dragmacidina F	<i>Halicortex</i> sp.	Alcalóide	Antiviral	Anti-infecciosa
Haplosamatos A e B	<i>Xestospongia</i> sp.	Esteróide	Antiviral (HIV-1)	Anti-infecciosa
Discoderminas B, C e D	<i>Discodermia kiiensis</i>	Peptídeo cíclico	Antibacteriano	Antimicrobiano
Arenosclerinas A, B e C	<i>Arenosclera brasiliensis</i>	Alcalóide Alquilpiperidino	Antibacteriano	Antimicrobiano
Spongistatina	<i>Hyrtios erecta</i>	Lactona	Antifúngico	Antimicrobiano
Kalihinenos X	<i>Acanthella cavernosa</i>	Isocianoterpenóide	-	Anti-incrustante
Kalihipirano B	<i>Acanthella cavernosa</i>	Isocianoterpenóide	-	Anti-incrustante

Fonte: Sipkema *et al.*, 2005; Mayer & Gustafson, 2008; Mayer *et al.*, 2009; Costa-Lotufo *et al.*, 2009.

1.5. Família Crambeidae e gênero *Monanchora* como fonte de compostos bioativos

As esponjas pertencentes à família Crambeidae estão enquadradas dentro da ordem Poecilosclerida e têm como características serem organismos incrustantes, apresentarem formato ramoso, irregular ou tubular, e habitarem em rochas, corais e mangues, principalmente em águas rasas. Alguns gêneros dessa família podem ocorrer em profundidades de até 180m. Uma característica bastante singular das espécies desta família é a presença de alcalóides guanidínicos cíclicos, tendo sido sugerido que estes compostos possam ser usados como marcadores taxonômicos para esses gêneros. Um aspecto bastante peculiar e interessante para estes compostos é a sua capacidade de perturbar interações proteína-proteína incluindo HIV-1 gp120-CD4, p56-CD4, HIV-1 Nef com p53, actina e p56. As interações desses compostos nas relações proteína-proteína fornecem novas ferramentas biológicas e sugere um potencial terapêutico (Tavares *et al.*, 1994; Van Soest, 2002).

A busca pelos alcalóides guanidínicos teve como marco inicial o isolamento do composto pentacíclico ptilomicalina A, por Kashman e colaboradores em 1989, da esponja marinha *Ptilocaulis spiculifer* coletada no Caribe. Esta classe de compostos é isolada predominantemente de esponjas pertencentes às ordens Poecilosclerida e Axinellida e são conhecidos por exibirem uma vasta variedade de atividades biológicas dentre elas citotóxica, antiviral e antibacteriana. A ordem Poecilosclerida compreende os gêneros *Crambe*, *Monanchora* e *Batzella*, enquanto a ordem Axinellida tem como representante o gênero *Ptilocaulis*, sendo todos os gêneros fontes ricas em alcalóides guanidínicos (Kashman *et al.*, 1989; Chang *et al.*, 2003; Hua, *et al.*, 2004).

Posteriormente ao isolamento inicial da ptilomicalina A (figura 9), este mesmo composto foi isolado da espécie *Hemimycale* sp. observando-se, nesse estudo, que este composto possuía atividade citotóxica potente em linhagens de células tumorais, e adicionalmente este mesmo composto apresentou atividade anti-fúngica contra *Candida albicans* e antiviral contra *Herpes simplex* tipo 1 (HSV-1), sendo este o único alcalóide guanidínico pentacíclico a apresentar esta atividade, desde então vários outros compostos foram isolados de esponjas marinhas dos gêneros acima citados (Heys *et al.*, 2000).

Em seguida foram reportado o isolamento de vários alcalóides guanidínicos como as crambescidinas 800, 816, 830, 844 e isocrambescidina 800 da esponja marinha do mediterrâneo *Crambe crambe*, muito comum em costões rochosos. Estes compostos

apresentam diversas atividades biológicas incluindo a atividade citotóxica, além de serem potentes antimicrobianos, antifúngicos, antivirais e bloqueadores de canais de cálcio (Berlinck, Braekman e Dalozze, 1993; Chang, Whittaker e Bewley, 2003; Lazaro *et al*, 2006; Hua *et al*, 2007).

O gênero *Monanchora* foi descrito pela primeira vez por Carter (1983) e semelhante aos gêneros pertencentes à família Crambeidae é uma fonte bastante promissora de alcalóides guanidínicos como crambescidinas, ptilocaulinas e batzelladinas, com diversas atividades biológicas. O primeiro relato deste tipo de composto foi reportado por Tavares em 1994 quando este isolou da esponja marinha brasileira *Monhanchora arbuscula* o alcalóide pentacíclico crambescidina 800 (figura 9), este composto também foi isolado posteriormente das espécies *Monanchora unguiculata* coletada na Indonésia por Suna (2007) que relatou uma potente atividade neuroprotetora, já Hua (2007) isolou o mesmo da espécie *Monanchora unguifera* coletada na costa do Caribe e destacou uma potente atividade citotóxica, anti-HIV e antimicrobiana.

O alcalóide 8b-hidroxiptilocalina (figura 13) foi primeiramente descrito por Tavares (1995) para a espécie *M. arbuscula* coletada na costa brasileira. Neste mesmo estudo foram isolados os alcalóides guanidínicos tricíclicos ptilocalina (figura 13) e isoptilocalina (figura 9), este por sua vez foi isolado recentemente da mesma espécie por Kossuga e colaboradores (2007). Hua (2004) descreveu o isolamento e a atividade anti-infecciosa dos alcalóides tricíclicos mirabilina B, e da mistura de epímeros composta por 1,8a,8b,3a-dideidro-8 β -hidroxiptilocalina e 1,8a,8b,3a-dideidro-8 α -hidroxiptilocalina isolados da espécie *Monanchora unguifera* (Tavares *et al*, 1995; Laville *et al*, 2009).

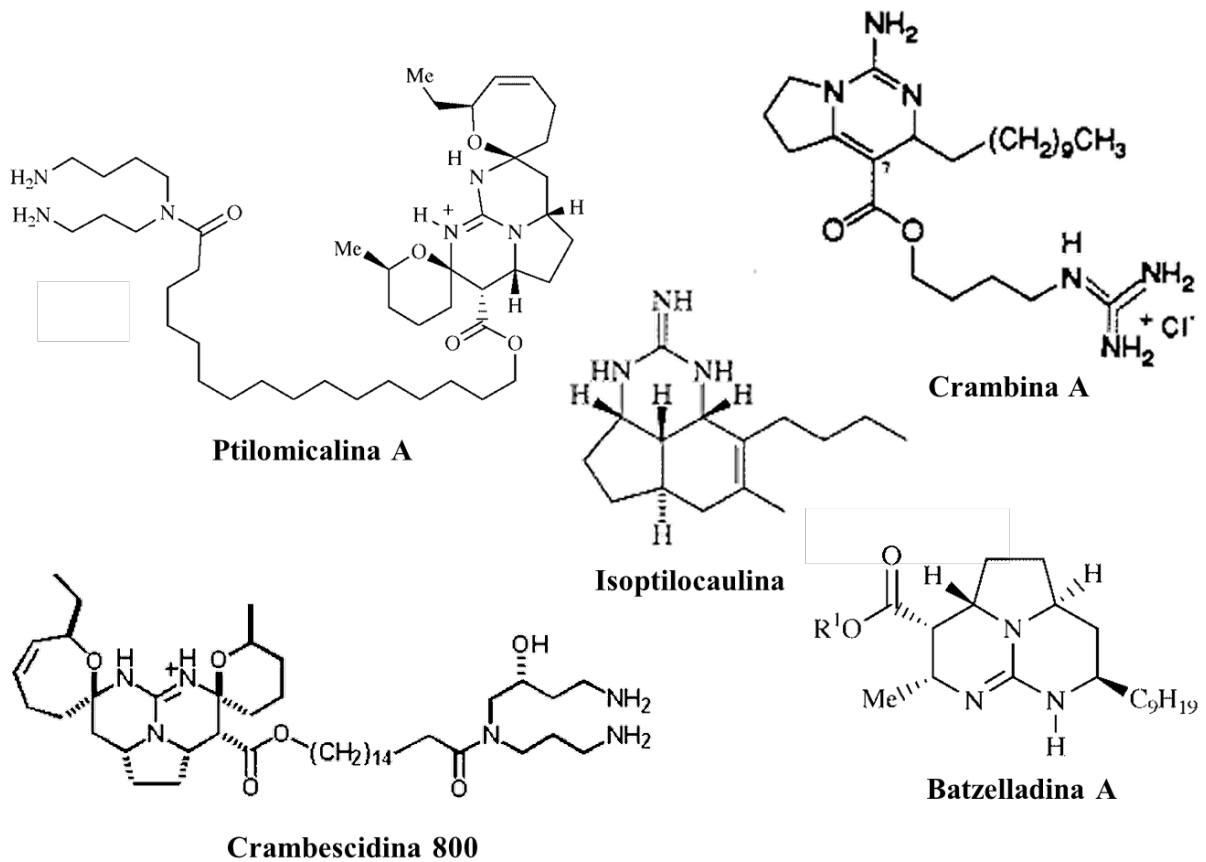


Figura 10 - Estruturas químicas de alcalóides guanidínicos.

1.6. Importancia dos alcalóides guanidínicos marinhos

Outros estudos já foram realizados para obtenção de compostos que apresentasse algum tipo de atividade biológica da espécie *M. arbuscula*, e comprovaram ser esta espécie uma fonte em alcalóides guanidínicos biologicamente ativos. Pesquisas feitas por Muricy e colaboradores (1993), avaliaram a atividade antimicrobiana e antifúngica do extrato metanólico de 21 espécies de esponjas do sudoeste do atlântico e observaram que o extrato da espécie *M. arbuscula*, coletada na costa do Rio de Janeiro, apresentou potente atividade antibacteriana e antifúngica, tendo sido este o primeiro relato de atividade antimicrobiana da espécie.

Recentemente, Kossuga e colaboradores (2007), realizaram estudos de investigação química e farmacológica, do extrato metanólico da esponja *Monanchora* aff.

arbuscula. A partir desse extrato foram realizados ensaios objetivando avaliar o potencial citotóxico, antibacteriano e antimicobacteriano, tendo este se mostrado potencialmente ativo em todas as atividades investigadas. Posteriormente, o grupo de Kossuga (2007) conseguiu isolar e caracterizar o alcalóide guanidínico isoptilocaulina, a partir do extrato, onde a referida substância apresentou potente atividade antibacteriana em cepas resistentes de *Staphylococcus aureus*, sendo este o primeiro relato de atividade antibacteriana deste composto.

Os alcalóides guanidínicos são alcalóides que possuem em sua estrutura o grupamento guanidina (NH₂-NH-NH₂), sendo os alcalóides, por sua vez, caracterizados pela presença de pelo menos um átomo de nitrogênio (N) no seu anel heterocíclico e derivados, geralmente, a partir de aminoácidos. Assim, os alcalóides guanidínicos, por sua espantosa diversidade estrutural, não individualizam, concretamente, um grupo químico particular. Isso porque o grupamento guanidina pode ser incorporado como o grupo funcional principal de um determinado alcalóide ou compondo uma molécula de estruturalmente complexa.

Não obstante, o interesse pelos alcalóides guanidínicos segue crescente desde os anos 50 até a atualidade, assim ilustrado pela figura 11 abaixo, que apresenta o número de trabalhos de revisão versado sob o tema “alcalóides guanidínicos”.

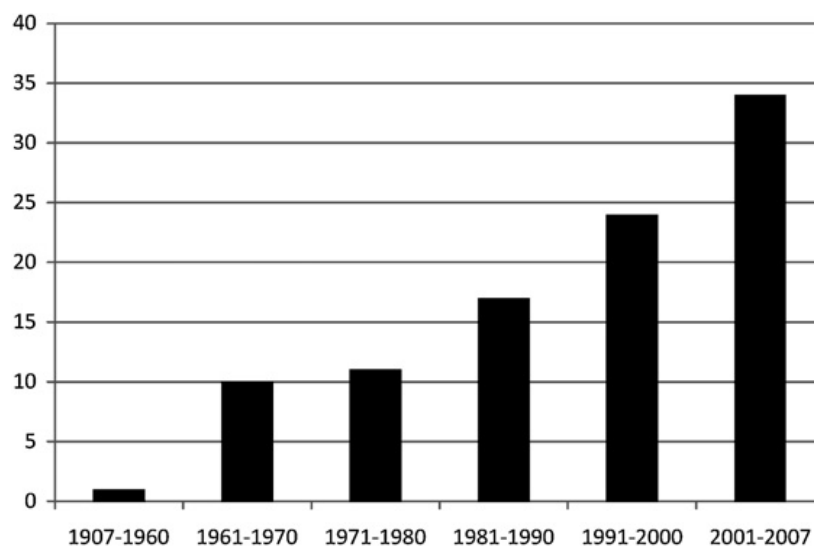


Figura 11 – Número de revisões acerca de alcalóides guanidínicos de ocorrência natural, síntese, biossíntese, atividade biológica, química (incluindo síntese e desenvolvimento de grupos protetores) e síntese bioativa de guanidinas em química medicinal. Fonte: Berlinck, Burtoloso e Kossuga, 2008.

Os estudos experimentais envolvendo o isolamento e elucidação estrutural, a determinação da via biossintética e a síntese de alcalóides guanidínicos naturais possuem uma dinâmica bastante peculiar. Ao passo que os trabalhos relatando o isolamento desses alcalóides aparecem relativamente constantes desde cerca-1994, sendo que em número muito mais baixo, os estudos envolvendo biossintese e síntese do composto natural mostra um discreto, porém simbólico, incremento ao longo dos anos (figura 12). Novas tecnologias e ferramentas investigativas certamente respondem por uma parcela deste aumento, visto que alguns alcalóides guanidínicos possuem estruturas bastante complexas e de síntese difícil. Mais além, técnicas de biologia molecular tem dado enorme contribuição para acessar genes e enzimas relevantes para a biossintese deste composto.

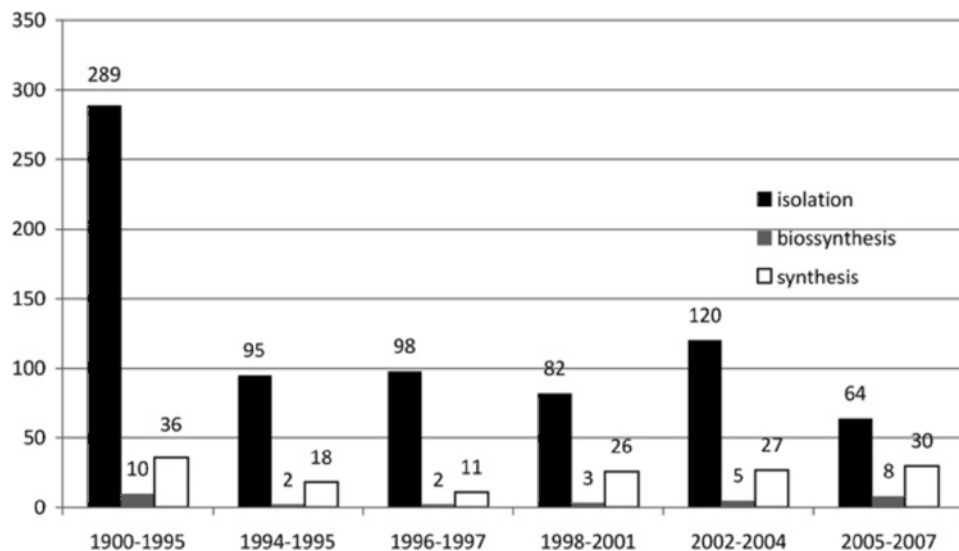


Figura 12 – Número de alcalóides guanidínicos que: (a) foram isolados; (b) tiveram sua via biossintética investigada ou; (c) foram sintetizados. Fonte: Berlinck, Burtoloso e Kossuga, 2008.

Os alcalóides guanidínicos de um modo geral, pela sua heterogeneidade estrutural, possuem um largo espectro de atividade biológica. Citotoxicidade, antimicrobiana, antiviral, antifúngico, antimalárico, antiprotozoários, bloqueador de canais de Na^+ e Ca^{2+} são algumas das atividades biológicas já registradas para moléculas dessa classe (Maragelman, McKee & McMahon, 2004). Em revisão recente elaborada por Nakao & Fusetani (2007) sobre inibidores enzimáticos obtidos de organismos marinhos, metabólitos secundários guanidínicos foram efetivos contra diversos tipos enzimáticos, a saber, geranyl-geranyltransferase tipo I,

receptor epidermal de fatores de crescimento, checkpoint quinases, quinases dependentes de ciclinas, fosfatases protéicas 1 e 2A, fosfolipase A2, fosfodiesterases, quitinases e serina e cisteína proteases.

Cilindrospermopsina é um alcalóide guanidínico cíclico produzido por diversas cianobactérias que habitam águas doces ou salgadas de regiões tropicais e subtropicais. Esta potente hepatotóxina age inibindo a síntese protéica, de modo a surtir efeito progressivo em outros órgãos vitais, não só o fígado (Ohtani *et al.*, 1992). Carcasanamida e caracasandiamida são dois agentes hipotensores isolados do extrato aquoso das folhas de *Verbesina caracasana*, uma planta da família Compositae. Quando caracasandiamida foi administrada em ratos por via intravenosa, observou-se um estímulo na respiração, no inotropismo cardíaco e na resistência vascular periférica. Em doses maiores, essa substância deprime o reflexo da respiração e promove hipotensão arterial (Delle Monache *et al.*, 1996). De *Pterogyne nitens*, uma árvore da família Fabaceae, isolou-se os alcalóides guanidínicos nitensidinas D e E, além de pteroginina, pteroginidina e galegina. A pteroginina, por sua vez, não se mostrou citotóxica, mas apresentou potencial antiangiogênico (Lopes *et al.*, 2009). O composto nitensidina D mostrou-se citotóxico contra células tumorais em cultura (Regasini *et al.*, 2009). Argiotoxina, um alcalóide guanidínico de cadeia lateral longa, foi isolado do veneno da aranha *Argiope lobata*. Essa substância foi utilizada como ferramenta para o estudo dos canais voltagem-dependente expressos nos oócitos de sapo (Raditsch *et al.*, 1996).

Como visto, os alcalóides guanidínicos possuem uma ampla ocorrência entre os organismos, já tendo sido isolados a partir de microrganismos terrestres, marinhos ou de água doce, plantas, invertebrados terrestres e invertebrados marinhos, com especial destaque para as esponjas marinhas.

A família Crambeidae, das qual pertencem as espécies de esponjas do gênero *Monanchora* é rica em alcalóides guanidínicos cíclicos. Essa classe de compostos é isolada, predominantemente, de esponjas pertencentes às ordens Poecilosclerida e Axinellida. Esses compostos são conhecidos por exibirem uma ampla variedade de atividades biológicas, dentre elas citotóxica, antiviral e antibacteriana, sendo freqüentemente isolados do gênero *Monanchora*, *Crambe*, *Ptilocaulis* e *Batzella*. Van Soest e colaboradores (1996) preferem reunir esses quatro gêneros de esponjas, e mais enfaticamente os três primeiros em um único gênero (Crambe), por razões de prioridade, pela similaridade de caracteres morfológicos e a presença de metabolitos secundários idênticos. No entanto alguns autores acreditam que a

presença de alcalóides guanidínicos em espécies taxonomicamente diferentes possa estar relacionada com a presença de microorganismos simbioses comuns a estas espécies (Heys; Moore; Murphy, 1999; Braekman et al., 2000; Hua et al., 2004; Hua et al., 2007). Inclusive, foram isolados das estrelas do mar *Celerina heffernani* e *Fromia monilis* coletadas na costa da Nova Caledônia, dois alcalóides guanidínicos identificados como celeromycalina e fromiamicalina, respectivamente. Além destes compostos foram também encontrados crambescidinas e ptilomicalina A, levando ao questionamento se estes compostos estariam relacionados a produção por microorganismos associados ou se eram oriundos da predação das esponjas pelas estrelas do mar (Berlinck, Braekman e Dalozze, 1993; Palagiano et al, 1995; Chang, Whittaker e Bewley, 2003; Lazaro et al, 2006; Hua et al, 2007). Mais além, a fromicalina foi posteriormente isolada de uma espécie de *M. arbuscula* coletada nos mares do Caribe, juntamente a outras moléculas estruturalmente relacionadas (Laville et al., 2009).

1.7. Relevância do trabalho

O estudo do ambiente marinho como fonte de moléculas com atividade biológica tem se tornado cada vez mais promissor, visto que 70% da superfície do planeta corresponde ao ecossistema marinho, os quais representam 95% da biosfera terrestre, abrigando uma grande biodiversidade. A vasta diversidade biológica encontrada no ambiente marinho correlaciona, intimamente, com uma larga diversidade química, que, por sua vez, tem se mostrado bastante promissora como fonte de produtos naturais com potencial biomédico (Burkhard & Haefner, 2003).

No caso particular do câncer, mais de 60% de todos os quimioterápicos introduzidos na clínica entre 1940 e 2006 possuem, em alguma instância, origem em fontes naturais (Newman & Cragg, 2007). Vale destacar, pois, que foram os tradicionais grupos de plantas e microorganismos terrestres que forneceram quase a totalidade das moléculas que estão computadas nas estatísticas atuais. Entretanto, o câncer permanece como a segunda causa de morte no mundo, representando 17% dos óbitos, e, no Brasil, estima-se que a ocorrência de novos casos de câncer será de 489.270 para os anos de 2010 – 2011. Apesar de haver uma grande quantidade de fármacos para o tratamento de neoplasias malignas e sucesso em diversas terapias, o número elevado de vítimas de câncer mostra o quanto a busca por

medicamentos mais eficazes, seletivos, que levem a uma menor resistência e efeitos colaterais se faz de extrema necessidade (INCA, 2010).

O ambiente marinho ocupa ainda a fatia menos explorada dentre as fontes de produtos naturais e, há até poucas décadas, permanecia praticamente inexplorado pelos grupos que pesquisam produtos naturais. Entretanto, os resultados obtidos durante os últimos 60 anos de estudos confirmam ser este uma fonte peculiar e relevante para a prospecção de recursos biomédicos, sobretudo, devido ao ineditismo, tanto químico quanto biológico, das moléculas ali encontradas (Costa-Lotufo *et al.*, 2009).

A vasta costa brasileira abriga um potencial latente para a descoberta de substâncias de interesse médico e farmacológico e a região nordestina compreende a maior parte do litoral tropical do Brasil, com aproximadamente 3000 km de extensão. A proximidade do Brasil a linha do Equador permite ao país uma localização que favorece a prospecção de compostos bioativos visto que de maneira geral, os organismos que habitam as áreas tropicais exibem maior diversidade e concentração de metabólitos secundários do que os que vivem em latitudes mais baixas. O Brasil possui a segunda maior costa oceânica mundial com uma extensão de 8.500km, sendo a região nordeste detentora de mais da metade da costa litorânea brasileira. Os estudos realizados sobre o potencial farmacológico da fauna marinha da costa cearense mostram a importância da fauna bentônica desta região como fonte de novas moléculas bioativas. Esses, por sua vez, ressaltam o potencial citotóxico resguardado em várias espécies de esponjas, ascídias, cnidários e microorganismos. Esses estudos revelaram um alto grau de endemismo das espécies ali encontradas e algumas substâncias inéditas que apresentam atividade biológica acentuada, sendo uma importante ferramenta para estudos de atividade anticâncer (Jimenez *et al.* 2004; Ferreira *et al.*, 2007; Jimenez *et al.*, 2008; Wilke *et al.*, 2009).

Além do potencial biomédico, os mares e oceanos são fontes ainda de compostos com importância para agroquímica, cosmética, alimentícia e como ferramentas científicas e diagnósticas (European Board Foundation Marine Board, 2001). Estes bioprodutos agregam relevante valor econômico aos recursos do mar. Visto a importância do ambiente marinho como fonte de novos compostos com potencial biomédico, podemos nos utilizar da biotecnologia como ferramenta. A indústria farmacêutica, particularmente, é a segunda mais próspera do mundo, movimentando hoje cerca de 0,65 trilhões de dólares por ano. Até o ano de 2020, este valor deve dobrar. Inclusive, algumas indústrias farmacêuticas já foram

fundadas com o objetivo de desenvolver fármacos a partir de protótipos obtidos exclusivamente do ambiente marinho. É o caso da companhia espanhola PharmaMar que, só nos últimos 20 anos investiu mais de 420 milhões de euros na pesquisa em fármacos com potencial para a terapia do câncer. Atualmente 3 substâncias já se encontram em fase pré-clínica e outras 5 estão em fase clínica de testes. Essas moléculas são provenientes de uma coleção de mais de 65.000 organismos, de onde foram descritas cerca de 700 novas substâncias (Pharmamar, 2010) A Nereus Pharmaceuticals é outra indústria especializada na prospecção de fármacos a partir de recursos marinhos. Com menos tempo de existência, já possui duas novas moléculas cumprindo a primeira fase dos testes clínicos, ambas para o tratamento de câncer (Nereus Pharmaceuticals, 2010).

A espécie *Monanchora arbuscula* destacou-se entre as 22 esponjas coletadas do Parque Estadual Marinho Pedra da Riasca do Meio avaliadas quanto ao seu potencial citotóxico, assim observado por Ferreira e colaboradores (2007). Neste estudo, seu extrato hidroalcoólico apresentou potente cictotoxicidade frente a quatro linhagens de células tumorais, além de inibir em 100% de inibição do desenvolvimento embrionário dos ovos de ouriço-do-mar.

É importante mencionar que este estudo está inserido em um projeto mais amplo, iniciado há cerca de 8 anos, que sugere o desbravamento do potencial farmacológico resguardado na costa do Ceará. Os estudos nesta área são considerados estratégicos por envolver o conhecimento da biodiversidade num sentido amplo e abrem uma nova vertente para a prospecção recursos do mar e gestão costeira. Ainda que recentes e relativamente escassos, os achados nesse campo despertam grande interesse pelos grupos que estudam produtos naturais e abrem caminhos para se seguir explorando novas fontes naturais na busca de substâncias bioativas (Pereira & Soares-Gomes, 2009).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a citotoxicidade *in vitro* de alcalóides guanidínicos obtidos da esponja *Monanchora arbuscula* coletada no Parque Estadual Marinho Pedra da Risca do Meio, Ceará.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e identificar alcalóides guanidínicos da esponja *Monanchora arbuscula* coletada no Parque Estadual Marinho Pedra da Risca do Meio, Ceará.
- Avaliar a atividade citotóxica dos compostos isolados em várias linhagens de células tumorais *in vitro* e o potencial hemolítico em eritrócitos murino obtidos de camundongos albinos (*Mus musculus*) da linhagem swiss.
- Estabelecer uma relação entre estrutura e atividade dos compostos obtidos.
- Determinar o mecanismo de atividade citotóxica do composto ptilocaulina (PT) utilizando células leucêmicas HL-60, como modelo de estudo.

3. METODOLOGIA

3.1. Coleta do Material

A espécie *Monanchora arbuscula* (figura 14) foi coletada no parque estadual marinho Pedra da Risca do Meio, Ceará (figura 13), a 10 milhas náuticas (aproximadamente 18,52 Km) do Porto do Mucuripe, em Fortaleza. O parque marinho compreende uma área de 33,20 Km² e está delimitado pelas seguintes coordenadas geográficas: A: 3° 33'800"S e 38°26'000"W, B: 3°36'000"S e 38°26'000"W, C: 3°36'000"S e 38°21'600"W e D: 3°33'800"S e 38°21'600".

A coleta foi realizada em profundidades que variam de 17 a 30 metros através de mergulho autônomo. Após a coleta do espécime, foi realizada a limpeza da mesma para retirada dos contaminantes, em seguida o material foi imerso em etanol (1,5L) e estocado em freezer a -18°C até a preparação do extrato bruto.

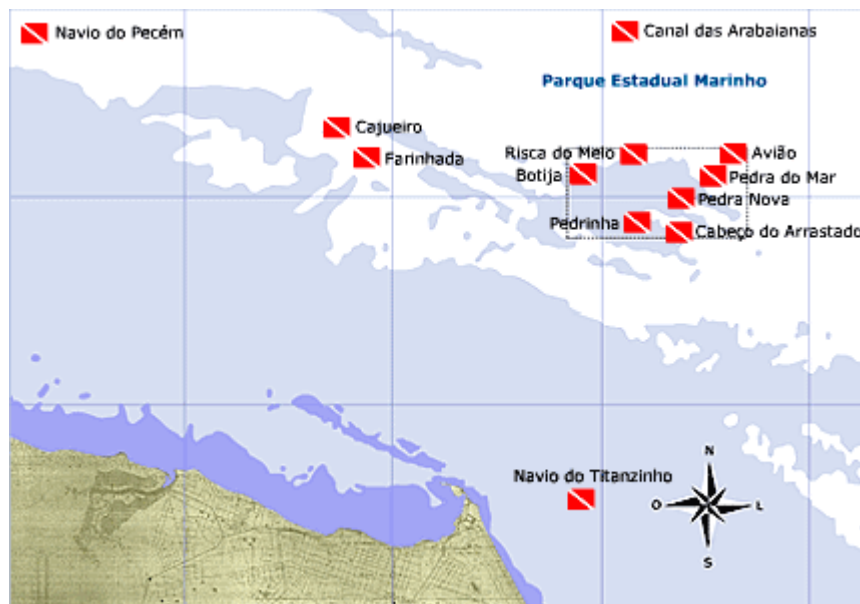


Figura 13 - Mapa do Parque Estadual Marinho Pedra da Risca do Meio - CE. **Fonte:** http://www.brasilmergulho.com.br/port/points/ce/images/mapa_gran.gif.

3.2. Identificação da espécie

O material coletado no Parque Estadual Marinho Pedra da Risca do Meio, em julho de 2004, foi separado e fixado em solução de etanol 70% (v/v) para a identificação da espécie realizada pelo Prof. Dr. Eduardo Hajdu e colaboradores do Museu Nacional de Poríferas, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

A espécie foi identificada como *Monanchora arbuscula* e armazenada no Museu Nacional de Poríferas sob o *voucher* MNRJ 8670 e MNRJ 8674.



Figura 14 - Fotografia da espécie *Monanchora arbuscula*, registrada no Parque Estadual Marinho Pedra da Risca do Meio, Ceará, em julho de 2004. Por Eduardo Hajdu.

3.3. Obtenção/Isolamento dos compostos

Esta etapa do trabalho foi realizada sob orientação do Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira, sob a co-orientação da Prof^a. Dr^a. Otília Deusdênia Lioiolo Pessoa e com participação da mestrande Julieta Rangel de Oliveira no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, onde o material coletado se manteve estocado.

As colônias de *Monanchora arbuscula* (Figura 14) (1,5kg) foram homogeneizadas e em seguida extraído por 72 horas com a mistura de solventes composta por diclorometano e metanol ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$) na proporção de 1:1 (v/v), em seguida os solventes foram removidos em evaporador rotativo a vácuo, que após seco deu origem ao extrato bruto. O extrato bruto foi submetido a uma partição química líquido-líquido utilizando solventes de polaridades diferentes – éter de petróleo, diclorometano, Acetato de etíla e metanol – as frações obtidas foram bioguiadas pela atividade citotóxica utilizando o ensaio do MTT em quatro linhagens de células tumorais. Em seguida as frações mais ativas foram secas e separadas em colunas cromatográficas. As frações diclorometano (MADCM) e acetato de etíla (MAAC) foram submetidas a cromatografias em coluna de SEPHADEX LH-20 e em sílica gel respectivamente, em seguida suas frações foram submetidas à análise por cromatografia em camada delgada e reunidas por similaridade. Depois de reunidas as frações foram submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e em seguida analisadas por RMN ^1H . O processo de purificação e isolamento dos alcalóides guanidínicos esta esquematizado no fluxograma abaixo (Figura 15).

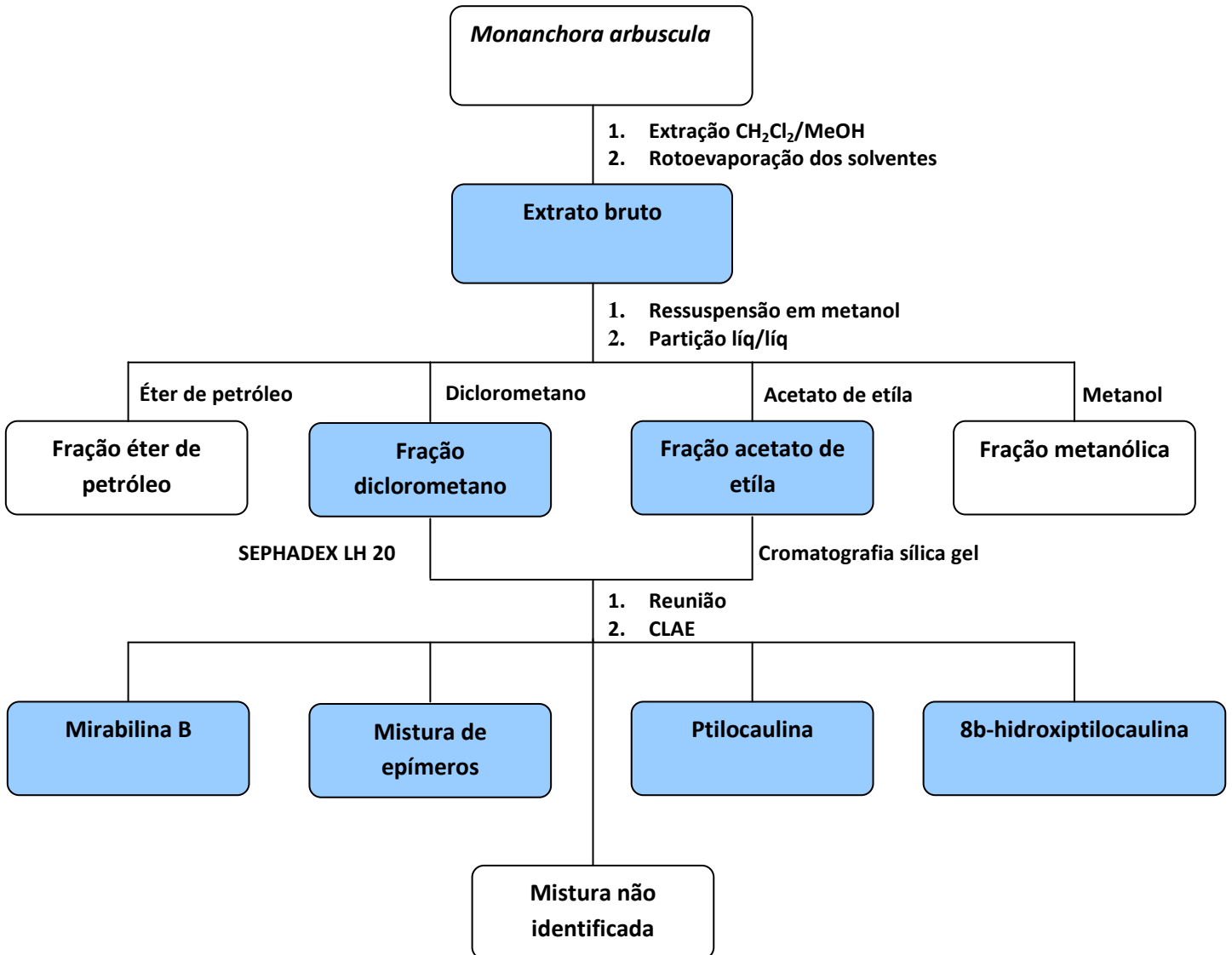


Figura 15 – Fluxograma da obtenção do extrato bruto de *Monanchora arbuscula* e respectivas partições líquido/líquido mostrando a obtenção das misturas e compostos puros das frações diclorometano e acetato de etila.

3.4. Determinação da Atividade Citotóxica

3.4.1. Ensaio MTT

Os alcalóides e as misturas de alcalóides foram investigados quanto a sua atividade antiproliferativa nas linhagens de células tumorais. A citotoxicidade foi avaliada através do método de MTT em quatro linhagens de células tumorais cedidas pelo 'National Cancer Institute - NCI' dos Estados Unidos. O método do MTT é quantitativo, indireto, rápido, sensível que analisa a viabilidade e o estado metabólico da célula, baseado na conversão do sal amarelo 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazolium (MTT) em um sal de coloração roxa (formazan), a partir da enzima succinil desidrogenase das mitocôndrias presentes somente nas células metabolicamente ativas. Ou seja, a solução amarela do MTT é reduzida pela atividade mitocondrial nas células metabolicamente ativas em um cristal roxo (MOSMANN, 1983).

As linhagens celulares utilizadas (Tabela 2) foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (Corning, 25 cm², volume de 50 mL para células aderidas e 75 cm², volume de 250 mL para células em suspensão), utilizando o meio de cultura RPMI 1640 complementado com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos (penicilina/estreptomicina). As células foram incubadas em estufa a 37 °C com atmosfera de 5 % de CO₂ e 95 % de umidade, seguido da observação do crescimento celular com ajuda de microscópio de inversão a cada 24 h, quando necessário às células foram repicadas em novo meio de cultura, em uma concentração de 2,0 x 10⁴ - 0,3 x 10⁶ céls/mL.

Tabela 2: Linhagens celulares tumorais utilizadas no ensaio de citotoxicidade *in vitro* através do método do MTT.

Linhagem Celular	Tipo Histológico do Câncer/Origem	Concentração de Plaquetamento (células/mL)
HL-60	Leucemia promielocítica humana	$0,3 \times 10^6$
MDA-MB 435	Melanoma humano	$0,1 \times 10^6$
HCT-8	Carcinoma de cólon humano	$0,7 \times 10^5$
SF-295	Glioblastoma humano	$0,1 \times 10^6$
PBMC	Células mononucleadas de sangue periférico	$2,0 \times 10^4$

As substâncias previamente diluídas em DMSO puro estéril para a concentração estoque de 1,0 mg/mL foram diluídas seriadamente em meio RPMI para obtenção das concentrações finais (0,009 - 5 µg/mL) e adicionadas em placa de 96 poços (100 µL/poço). O quimioterápico doxorrubicina foi usado como controle positivo. Após um período de incubação de 69 h, as placas foram retiradas e centrifugadas a 1500 rpm/15 min. O sobrenadante foi aspirado e foi adicionado 200 µL de solução de MTT 10 % em RPMI 1640, sendo a placa colocada na estufa a 5 % de CO₂ por 3 h. Em seguida, as placas foram novamente centrifugadas a 3000 rpm/10 min, tendo o sobrenadante aspirado e seu precipitado ressuspenso em 150 µL de DMSO e agitado por cerca de 10 min, até completa dissolução dos cristais de formazan.. As placas foram lidas no espectrofotômetro de placas a um comprimento de onda de 595 nm.

3.4.2. Ensaio do Alamar Blue

Para investigar atividade antiproliferativa dos compostos ativos, em células mononucleadas de sangue periférico (PBMC), foi realizado o teste do Alamar Blue num período de 72 h de exposição com a amostra. As PBMC foram isoladas de voluntários saudáveis, sendo em seguida diluídas e plaqueadas em placa de 96 poços ($2,0 \times 10^4$ cél/poço em 100µl de meio). Depois de 24h, os compostos foram adicionados em cada poço (usando HTS - high-throughput screening - biomek 3000 - Beckman Coulter, Inc. Fullerton, Califórnia, EUA) e incubada por 72h. Doxorubicina (0,009 a 5 µg/mL) foi usada como controle positivo. Grupos controle receberam a mesma quantidade de DMSO. Quatro horas antes do final da incubação,

10 μ L de solução estoque (0.312 mg/mL) de Alamar Blue (resazurin - Sigma Aldrich Co. - St. Louis, MO/USA) foi adicionada em cada poço. A absorbância foi medida usando leitor de multiplacas (DTX 880 Multimode Detector, Beckman Coulter, Inc. Fullerton, Califórnia, EUA). O efeito dos compostos foi quantificado como percentagem da absorbância do controle a 570nm e 595nm. A absorbância do meio sozinho foi subtraída da absorbância do meio com alamar Blue. Este valor é chamado de AO_{HW}. O fator de correção R₀ pode ser calculado de AO_{HW} e AO_{LW}, onde $R_0 = AO_{LW}/AO_{HW}$. A percentagem de alamar Blue reduzido é expressa como: % Reduzida = $A_{LW} - (A_{HW} \times R_0) \times 100$.

3.4.3. Análise dos dados

As drogas foram testadas em diluição seriada, em triplicata. Suas CI₅₀ (concentração inibitória média capaz de provocar 50 % do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95 %) foram calculados a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prisma versão 3.0 (GraphPad Software).

3.5. Avaliação do dano à membrana plasmática – Teste Hemolítico

O sangue foi coletado de três camundongos Swiss (*Mus musculus*) por via orbital, sendo diluído em 30 volumes de solução salina (NaCl 0,85 % + CaCl₂ 10 mM). Os eritrócitos foram lavados três vezes em solução salina por centrifugação (1500 rpm/3 min) para redução da contaminação plasmática e ressuspensos em salina para obtenção de uma suspensão de eritrócitos a 2 %. Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços. Cada poço da 1ª fileira recebeu 100 μ L da solução salina. Na 2ª, os poços receberam 50 μ L da solução salina e 50 μ L do veículo de diluição da substância teste, neste caso, DMSO 10 %. Aos poços da 3ª fileira, foram adicionados 100 μ L de solução salina e 100 μ L da substância teste. Da 4ª fileira em diante os poços receberam 100 μ L da solução salina, excetuando-se os da última fileira, que receberam 80 μ L de solução salina e 20 μ L de Triton X-100 1 % (controle positivo). As diluições foram feitas da 3ª à 11ª cavidade, retirando-se 100 μ L da solução da cavidade anterior e transferindo para a seguinte de modo que as concentrações foram sempre diluídas pela metade, variando de 1,56 a 200 μ g/mL. Em seguida, 100 μ L da suspensão de eritrócitos foram plaqueados em todos os poços. Após incubação de 1 h, sob agitação constante à temperatura ambiente (26 \pm 2 °C), as amostras foram centrifugadas (5000 rpm/3 min) e o

sobrenadante transferido para uma outra placa para a leitura da absorbância no espectrofotômetro de placas a 540 nm.

3.5.1. Análise dos dados

A concentração efetiva média (CE_{50}) foi determinada de maneira relativa aos controles positivo e negativo utilizando o programa GraphPad Prism 5.0.

3.6. Estudos de Mecanismo de Ação

3.6.1 Viabilidade celular - Exclusão por Azul de Tripán

O teste de exclusão por azul de tripan permite quantificar separadamente as células viáveis das células não viáveis pela substância testada. O corante penetra em todas as células, porém somente as células viáveis conseguem bombear o tripan para fora, sendo possível observar uma coloração azulada nas células mortas.

Células da linhagem HL-60, na concentração de $0,3 \times 10^6$ céls/mL, foram incubadas por 24 h com o composto PT, nas concentrações de 10, 15 e 20 μ M estimadas a partir do valor da CI_{50} encontrada no método do MTT para esta mesma linhagem celular. Foram retirados 90 μ L da suspensão de células e adicionado a 10 μ L do azul de tripan. As células viáveis e as células não viáveis foram diferenciadas e contadas em câmara de Neubauer. A doxorubicina (0,3 μ g/mL) foi usada como controle positivo.

3.6.1.1. Análise dos dados

Os dados foram expressos como da média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de experimentos independentes ($n = 3$). Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls, usando o programa GraphPad (Intuitive Software for Science, San Diego, CA) com nível de significância de 5 % ($p < 0,05$).

3.6.2. Inibição da síntese de DNA – Ensaio do BrdU

Células da linhagem HL-60, na concentração de $0,3 \times 10^6$ céls/mL, foram incubadas por 24 h com o composto PT e examinadas ao microscópio de inversão, nas concentrações de 10, 15 e 20 μ M. Três horas antes do final do período de incubação adicionou-se o 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU) na cultura de células. As lâminas para cada amostra foram preparadas e postas para secar por 2 h. Após o período de secagem foram fixadas em metanol por 1 min. As células foram lavadas com tampão Tris (TBS) e incubadas em solução desnaturante por 90 min a 70 °C e pH 7,4. Após uma segunda lavagem com TBS, a região da lâmina, onde se encontram as células, foi circulada com caneta hidrofóbica. Em seguida as lâminas foram colocadas em câmara úmida e imediatamente foi aplicado o anticorpo primário sob a região onde se localizam as células. Após este procedimento as lâminas foram deixadas em incubação durante duas horas em estufa de CO₂. As células foram incubadas com anticorpo secundário biotinado por 20 min e, em seguida, com a solução de estreptavidina-fluoresceína por mais 20 min. Foi adicionado o cromógeno diaminobenzidina (DAB) por 20 – 30 segundos e, em seguida, removido com água destilada. Para corar as células não marcadas pelo cromógeno, utiliza-se hematoxilina (0,1 %). Consideram-se positivas para proliferação, as células de núcleo corado pelo DAB (cor marrom) e, negativas, as células de núcleo corado com hematoxilina (cor azul).

3.6.2.1. Análise dos dados

Duzentas células foram contadas, diferenciando-as entre núcleo marrom (incorporaram o BrdU) e não-marrom (não incorporam o BrdU). Os dados foram expressos como da média \pm E.P.M. de experimentos independentes ($n = 2$). A proporção de células marcadas e não marcadas, em marrom, entre os diferentes grupos foi comparada pelo teste χ^2 com nível de significância de 5 % ($p < 0,05$) usando o programa GraphPad (Intuitive Software for Science, San Diego, CA).

3.6.3. Coloração diferencial por BE/LA

O método de coloração por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina (BE/LA) permite diferenciar células viáveis daquelas em processo de morte por apoptose ou necrose cuja revelação por fluorescência se baseia em alterações morfológicas nucleares e citoplasmáticas (McGAHON *et al.*, 1995).

A laranja de acridina intercala-se ao DNA, conferindo aparência verde ao núcleo celular, sendo capaz de atravessar membranas intactas. O brometo de etídio é incorporado majoritariamente por células não viáveis (com instabilidade de membrana), intercalando-se ao DNA. As células viáveis com membrana intacta apresentam núcleo uniformemente corado de verde pela LA. O BE marca muito fracamente ou muitas vezes não marca, pois não atravessa membranas não lisadas. As células em apoptose inicial (membrana ainda intacta) apresentam manchas verdes brilhantes no núcleo (condensação da cromatina) e não são marcadas por BE. Morfologicamente, observam-se alterações da membrana em decorrência da formação de corpúsculos apoptóticos. As células que se encontram em apoptose tardia apresentam aparência alaranjada devido a algum dano causado pelo composto, ou mesmo pelo processo de apoptose, a membrana plasmática permitindo a entrada de pequena quantidade de BE. Já as células necróticas, por apresentarem intenso dano à membrana plasmática, coram-se de vermelho intenso.

Células da linhagem HL-60, plaqueadas na concentração de $0,3 \times 10^6$ céls/mL, foram incubadas por 24 h com PT nas concentrações de 10, 15 e 20 μM . A suspensão de células foi transferida para um tubo eppendorf e centrifugada por 5 min em baixa rotação (10 x g/5 min. correspondente a 1000 rpm/5 min.). O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 20 μL de solução de PBS. Em seguida, 1 μL da solução de BE/LA foi adicionado a cada tubo e uma alíquota dessas células transferido para uma lâmina e montado com lamínula e em seguida levadas ao microscópio de fluorescência para observação dos eventos celulares. A Doxorrubicina (0,3 $\mu\text{g/mL}$) foi usada como controle positivo (Geng *et al.*, 2003).

3.6.3.1. Análise dos dados

Para a quantificação percentual de cada evento celular (viáveis, necróticas e apoptóticas), foram contadas 300 células de cada amostra e montadas em lâminas que foram fotografadas para o registro visual de possíveis alterações. Os dados foram expressos como da média \pm E.P.M. de experimentos independentes ($n = 3$). Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls ($p < 0,05$), usando o programa GraphPad (Intuitive Software for Science, San Diego, CA).

3.6.4. Coloração por May-Grunwald-Giemsa

A coloração por May-Grunwald-Giemsa se baseia em interações eletrostáticas entre os corantes e moléculas-alvo. Essa coloração possui azul de metileno (corante básico), eosina (corante ácido), entre outros componentes básicos que permite distinguir o citoplasma e o núcleo, sendo possível analisar a célula quanto a sua integridade nuclear, bem como alterações no citoplasma e núcleo. Após o término de incubação (24h) lâminas foram preparadas, com 50µL da suspensão de células, em citocentrífuga (cytospin) e fixadas com metanol 100% por 1 minuto. Em seguida as lâminas foram coradas com May-Grunwald, por 10 seg, e em seguida com Giemsa por 10 seg.

3.6.4.1. Análise dos dados

As lâminas contendo as células coradas foram levadas ao microscópio para avaliação das suas características morfológicas e comparadas ao controle (não tratado). O registro das alterações celulares foi feito por fotografia.

3.7. Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é um método rápido e preciso que se baseia no desvio da luz incidida sobre a célula para frente e para o lado, sendo uma importante ferramenta para acessar a potência e a especificidade de drogas anticâncer. A capacidade de um agente se intercalar a uma célula e emitir fluorescência nos permite identificar alterações quer sejam morfológicas, bioquímicas e moleculares que ocorrem durante a apoptose (Ramanathan, 1997).

3.7.1. Determinação da Integridade de Membrana

Este método consiste na capacidade do iodeto de propídeo (IP) se ligar ao DNA de células cuja membrana plasmática esteja rompida, como nos casos de apoptose tardia e necrose, emitindo uma alta fluorescência quando excitado pelo laser de argônio (488nm). Nas células cuja membrana permanece íntegra (células viáveis), o IP não consegue penetrar e, portanto emite uma fluorescência mais baixa, com isso as células com membrana íntegra podem ser diferenciadas daquelas com membrana rompida.

Células de HL-60 foram plaqueadas em placas de 24 poços, na concentração de $0,3 \times 10^6$ células/mL, e incubadas por 24 h com o composto PT nas concentrações de 10, 15 e 20 μM . A doxorubicina (0,5 μM) foi usada como controle positivo. Após o período de incubação uma alíquota de 50 μL da suspensão de células foi transferida para um tubo eppendorf e incubada por mais 5 minutos com 100 μL de IP (50 $\mu\text{g/mL}$). Em seguida as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (EasyCyte da Guava Technologies).

3.7.1.1. Análise de dados

Em cada experimento foram contados 5000 eventos. Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de três experimentos independentes ($n = 3$). Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os grupos, os dados serão comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Dunnet, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3.7.2. Ciclo celular e fragmentação de DNA

O método consiste na capacidade do iodeto de propídeo se ligar ao DNA das células, para tanto a membrana plasmática não desestabilizada foi primeiramente lisada utilizando um Triton, permitindo assim a entrada do corante no núcleo. Como a intensidade de fluorescência emitida pelo Iodeto de propídeo é proporcional a quantidade de ao qual está ligado, permitiu - se diferenciar as fases do ciclo em cujas células se encontravam, sendo elas G₀/G₁, S e G₂/M. O sub-G₁, representa o DNA fragmentado e que, portanto emite baixa fluorescência, sendo indicativo de apoptose.

Células de HL-60 foram plaqueadas em placas de 24 poços, na concentração de $0,3 \times 10^6$ células/mL, e incubadas por 24 h com o composto nas concentrações de 10, 15 e 20 μM , sendo a doxorubicina (0,5 μM) foi usada como controle positivo. Após o período de incubação uma alíquota de 50 μL da suspensão de células foi transferida para um tubo eppendorf e incubada por mais 30 minutos com 100 μL de uma solução de lise contendo PI (50 $\mu\text{g/mL}$), Triton X-100 (0,1%) e citrato de sódio (0,1%). Em seguida as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (EasyCyte da Guava Technologies), onde foram obtidas histogramas representando a quantidade de células em cada fase do ciclo celular (G₁, S e G₂/M) e a quantidade de células com DNA fragmentado.

3.7.2.1. Análise de dados

Em cada experimento foram contados 5000 eventos. Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de três experimentos independentes ($n = 3$). Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados serão comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Dunnet, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3.7.3. Despolarização Mitocondrial

Esse teste baseia-se na capacidade da mitocôndria sequestrar a rodamina 123, um corante fluorescente nucleofílico, quando esta apresenta potencial transmembrânico inalterado. Dessa forma, células contendo rodamina emitem alta fluorescência quando excitadas pelo laser. No entanto, ao entrar em apoptose, a célula sofre um influxo de íons H^+ através da membrana mitocondrial interna, induzindo uma alteração de seu potencial transmembrânico. Alterações no potencial mitocondrial transmembrânico levam ao efluxo da rodamina, gerando eventos que emitirão menor fluorescência quando comparada com as células que possuem mitocôndrias normais.

Células de HL-60 foram plaqueadas em placas de 24 poços, na concentração de $0,3 \times 10^6$ células/mL, e incubadas por 24 h com o alcalóide guanidínico nas concentrações de 10, 15 e 20 μM . A doxorrubicina (0,5 μM) foi usada como controle positivo. Após o período de incubação uma alíquota de 50 μL da suspensão de células foi transferida para um tubo eppendorf e incubada por mais 15 minutos com 200 μL de uma solução de rodamina 123 (1 $\mu g/mL$ em PBS), na ausência de luz e a 37 °C. Após o período de incubação as células foram centrifugadas e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuscitado em PBS e reincubado por mais 30 minutos e analisadas por citometria de fluxo (EasyCyte da Guava Technologies).

3.7.3.1. Análise dos dados

Em cada experimento foram contados 5000 eventos. Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de três experimentos independentes ($n = 3$). Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Dunnet, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1. Compostos isolados

As frações extraídas com solventes de polaridade intermediária, diclorometano (MADCM) e acetato de etila (MAAC), obtidas do extrato bruto da esponja marinha *Monanchora arbuscula* destacaram-se quanto ao potencial citotóxico com CI_{50} variando de 1,17 a 3,05 $\mu\text{g/mL}$ e 1,13 a 2,08 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente em células tumorais das linhagens melanoma (MDAMB435) e glioblastoma (SF295) (Tabela 03). Destas frações foram isolados três alcalóides guanidínicos puros e uma mistura de epímeros. Os alcalóides tiveram suas estruturas determinadas por espectro de RMN ^1H . Os compostos identificados foram denominados mirabilina (1), 8b-hidroxiptilocalina (2), ptilocalina (3) e a mistura de epímeros composta por 1,8a,8b,3a-dideidro-8 β -hidroxiptilocalina (4) e 1,8a,8b,3a-dideidro-8 α -hidroxiptilocalina (5) (figura 16).

Tabela 3 - Atividade antiprolifertiva do extrato bruto e das frações obtidas, avaliadas pelo ensaio do MTT após 72hs de incubação em células tumorais. Os valores representam suas CI_{50} e $IC_{95\%}$ ($\mu\text{g/mL}$).

Amostras	MTT			
	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)			
	IC 95%			
	HL-60	HCT-8	MDAMB435	SF295
Extrato Bruto	2,178	5,417	1,740	7,550
	1,848–2,567	3,716–7,897	1,513–2,000	6,415–8,886
MADCM	1,445	2,310	1,166	3,051
	1,210–1,725	2,039–2,616	0,959–1,418	2,274–4,094
MAAC	1,314	1,869	1,128	2,085
	1,193–1,447	1,678–2,083	0,956–1,331	1,937–2,244
MAME	2,498	2,865	4,216	7,044
	2,065–3,021	1,972–4,162	3,509–5,066	5,353–9,269
MAEP	7,715		15,64	
	6,094–9,768	>25	14,43–16,95	>25

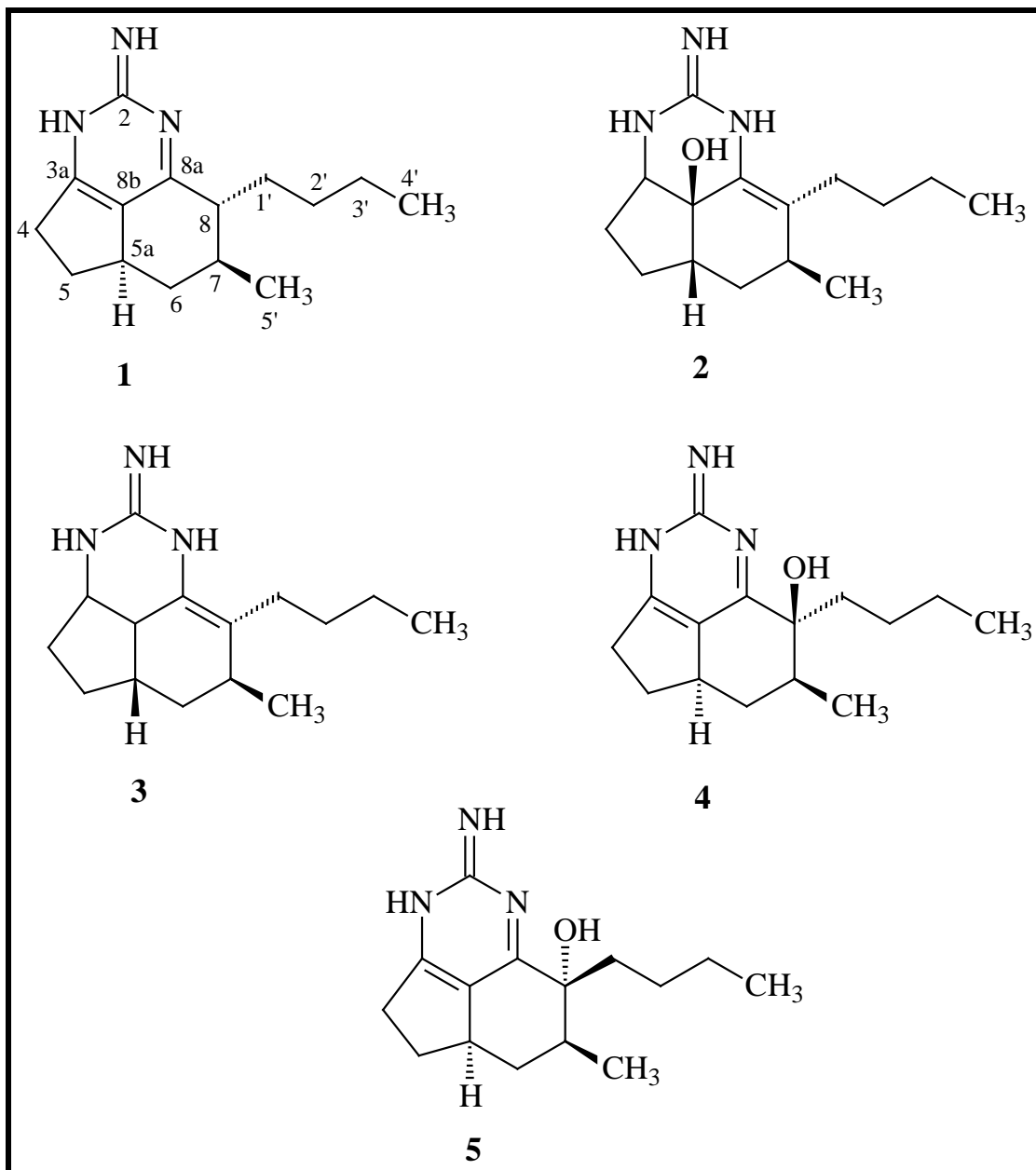


Figura 16 - Estrutura química dos alcalóides guanidínicos isolados da esponja marinha *Monanchora arbuscula*, Mirabilina B (1), 8β-hidroxiptilocaulina (2), ptilocaulina (3), 1,8α,8b,3a-dideidro-8β-hidroxiptilocaulina (4) e 1,8α,8b,3a-dideidro-8α-hidroxiptilocaulina (5).

4.2. Atividade Citotóxica dos compostos

Os compostos e misturas foram avaliados quanto ao seu potencial citotóxico em quatro linhagens de células tumorais (tabela 4) pelo ensaio do MTT após o período de 72 horas de incubação, ensaio que permite quantificar a proliferação celular e permitiu determinar a concentração inibitória média (CI₅₀). Os Resultados obtidos demonstraram que os compostos ptilocaulina (PT) e 8b-hidroxiptilocaulina (8HPT) apresentaram atividade citotóxica contra as linhagens de células tumorais, mostrando, inclusive, uma relativa seletividade para as linhagens de melanoma (MDA-MB-435) e leucemia (HL-60), sendo a ptilocaulina mais ativa que o alcalóide 8b-hidroxiptilocaulina (Tabela 4). Os compostos PT e 8HPT apresentaram maior citotoxicidade para as linhagens tumorais em comparação a PMBC (Tabela 3).

4.3. Avaliação quanto ao dano em membrana plasmática

Os compostos PT e 8HPT foram incubados por 1 hora em solução de eritrócitos de camundongos *Mus musculus* para avaliar o dano à membrana plasmática. Ambos os compostos apresentaram potencial em causar dano à membrana plasmática, sendo o composto PT mais hemolítico que o composto 8HPT (Tabela 3).

Tabela 4 – Citotoxicidade em linhagens de células tumorais pelo ensaio do MTT, em células mononucleadas de sangue periférico (PBMC) – teste do ALAMAR BLUE – e potencial de dano em membrana em eritrócitos de camundongos pelos alcalóides guanidínicos obtidos de *M. arbuscula*.

AMOSTRAS	MTT CI ₅₀ µM IC 95%				ALAMAR BLUE™ CI ₅₀ µM IC 95%	HEMÓLISE CE ₅₀ µM IC 95%
	HL-60	HCT-8	MDA-MB-435	SF-295	PBMC	
Mirabilina B	> 20,4	> 20,4	> 20,4	> 20,4	N.T.	N.T.
8b-hidroxiptilocaulina	7,9	> 19,0	11,3	> 19,0	> 19,0	577,9
Ptilocaulina	5,8	17,7	7,5	> 20,3	> 20,3	352,9
Mistura de epímeros	> 25,0 (µg/mL)	> 25,0 (µg/mL)	> 25,0 (µg/mL)	> 25,0 (µg/mL)	N.T.	N.T.
Doxorrubicina	0,04	0,07	0,86	0,42	1,7	N.T.

N.T. – Não testado

4.4. Relação estrutura atividade

Os alcaloides guanidínicos isolados apresentam estruturas bastante semelhantes, entretanto observou-se que os compostos (2) e (3) apresentaram potente atividade citotóxica contra as linhagens tumorais testadas, diferindo do composto (1) e da mistura de epímeros formada pelos compostos (4) e (5), que não apresentaram atividade citotóxica. A potente atividade apresentada pelos alcaloides (2) e (3) pode estar relacionada à presença da dupla ligação entre os carbonos 3a e 8b, não observada nos demais compostos. Por outro lado a presença das duplas ligações entre os carbonos 8 e 8a e os carbonos 1 e 8a observadas nos compostos (1), (4) e (5) estariam relacionadas a ausência de atividade citotóxica desses compostos.

Embora os compostos (2) e (3) possuam bastantes semelhanças estruturais entre si é possível encontrar diferenças relevantes, quanto ao seu potencial citotóxico, pois a ausência da hidroxila no carbono 8b no composto (3) proporciona a uma maior citotoxicidade quando comparado ao composto (2) que, por sua vez, apresenta a hidroxila ligada ao mesmo carbono da sua estrutura, entretanto ambas as moléculas possuem o mesmo perfil de atividade.

4.5. Determinação do mecanismo de ação

Para determinação dos mecanismos de ação envolvidos na morte celular, o composto mais ativo PT foi testado na linhagem tumoral HL-60 (leucemia) nas concentrações de 10, 15 e 20 μ M, sendo esta linhagem a mais sensível ao composto como demonstrado no ensaio do MTT.

4.5.1. Avaliação da viabilidade celular por exclusão do azul de Tripán

O composto PT reduziu significativamente o número de células viáveis em todas as concentrações testadas ($p < 0,01$). Apenas a concentração de 20 μ M aumentou o número de células não viáveis quando comparados com a doxorrubicina, usada como controle positivo na concentração de 0,55 μ M.

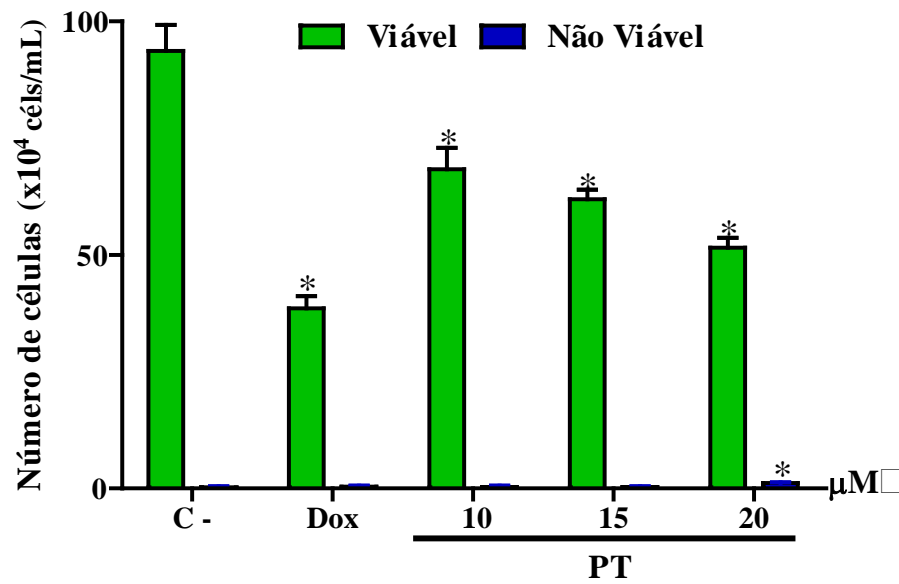


Figura 17 - Efeito do alcalóide PT nas concentrações de 10, 15 e 20 μM na viabilidade de células leucêmicas HL-60 determinado por Exclusão do Azul de Tripán após 24 horas de incubação. O controle negativo representa as células não tratadas. A Doxorubicina (Dox) representa o controle positivo (0,55 μM). Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de experimentos independentes (N=3). * $p < 0,001$ comparado ao controle por ANOVA seguido por Student Newman-Keuls Test.

4.5.2. Inibição da síntese de DNA – Ensaio do BrdU

O ensaio de incorporação do 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU) permite avaliar a proliferação celular pela capacidade do composto em diminuir o número de células capazes de incorporar o BrdU, um análogo da timidina, a síntese do DNA.

O alcalóide PT diminuiu a incorporação do BrdU em todas as concentrações testadas, sendo a maior concentração (20 μM) com inibição de incorporação de BRDU bastante semelhante a doxorrubicina, controle positivo utilizado.

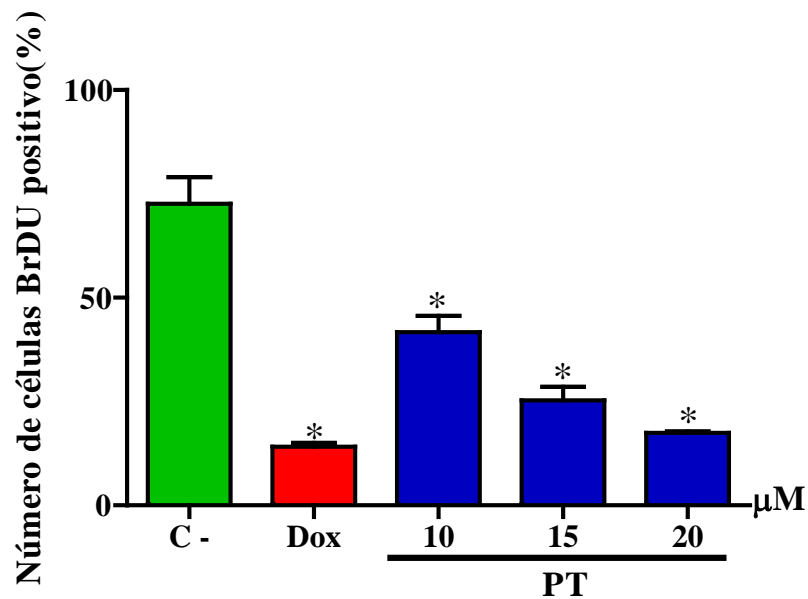


Figura 18 - Efeito do alcalóide guanidínico PT nas concentrações de 10, 15 e 20 μ M sobre a inibição da síntese de DNA avaliado pela incorporação do BrDU (BrDU positivo) avaliados na linhagem tumoral de células leucêmicas HL-60 após 24 horas de incubação. Controle negativo (C-) representa as células não tratadas e Doxorubicina (Dox) utilizado como controle positivo. Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de experimentos independentes (N=2), comparado pelo teste do χ^2 com nível de significância de 5% (* $p < 0,005$).

4.5.3. Coloração diferencial por BE/LA

A coloração por brometo de etídeo (BE) e laranja de acridina (LA) permite diferenciar os tipos de morte celular causado pelas moléculas, pois durante o processo de morte celular as células apresentam alterações morfológicas típicas e mudanças nas suas estruturas intracelular. O corante, laranja de acridina é permeável a todas as células, sendo as células viáveis marcadas apenas por este corante, as células que se encontram em processo de apoptose a membrana celular permanece íntegra, porém já permite a entrada do brometo de etídeo a elas permitindo assim diferenciá-la. Enquanto na necrose a característica básica é a perda da integridade da membrana plasmática da célula.

O alcalóide guanidínico PT nas concentrações de 10, 15 e 20 μ M foi capaz de reduzir o número de células viáveis em todas as concentrações testadas. De mesmo modo o composto promoveu um aumento de células em apoptose para todas as concentrações testadas, não havendo diferença significativa entre as concentrações 15 e 20 μ M e o controle

positivo. Não ocorreu alteração no número de células com características de necrose em nenhuma das amostras.

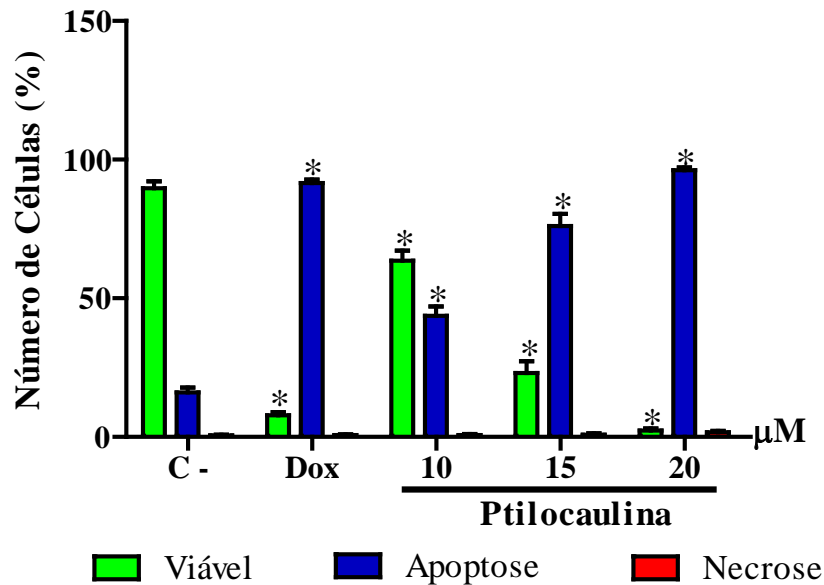


Figura 19 - Avaliação da atividade do composto PT nas concentrações de 10, 15 e 20 µM, sobre o padrão de morte celular em células leucêmicas HL-60 e analisada por brometo de etídio/laranja de acridina após 24 horas de incubação. O controle negativo (C-) representa as células não tratadas e a doxorrubicina (Dox) foi utilizada como controle positivo. Os dados correspondem à média +- E.P.M. de experimentos independentes (N=3). * $p < 0,001$ comparado ao controle por ANOVA seguido por Student Newman-Keuls Test.

4.5.4. Análise de alterações morfológicas

As células da linhagem HL-60, quando tratadas com o antitumoral Doxorrubicina, utilizado como controle positivo, e o alcaloide PT nas concentrações de 10, 15 e 20µM, sofreram alterações em sua morfologia celular, com se pode observar na figura 20. Essas alterações morfológicas não foram observadas nas células não tratadas, representadas como controle negativo, o que, no entanto, apresentou características próprias de células normais.

Observou-se que as células tratadas com PT nas concentrações de 10, 15 e 20µM apresentaram alterações morfológicas e estruturais, como a presença de prolongamentos da membrana plasmática (blebs) e vacuolização citoplasmática em todas as concentrações testadas, além de fragmentação de DNA, necrose e diminuição do volume celular, observadas principalmente nas maiores concentrações testadas o que leva a evidenciar a morte por apoptose (figura 20).

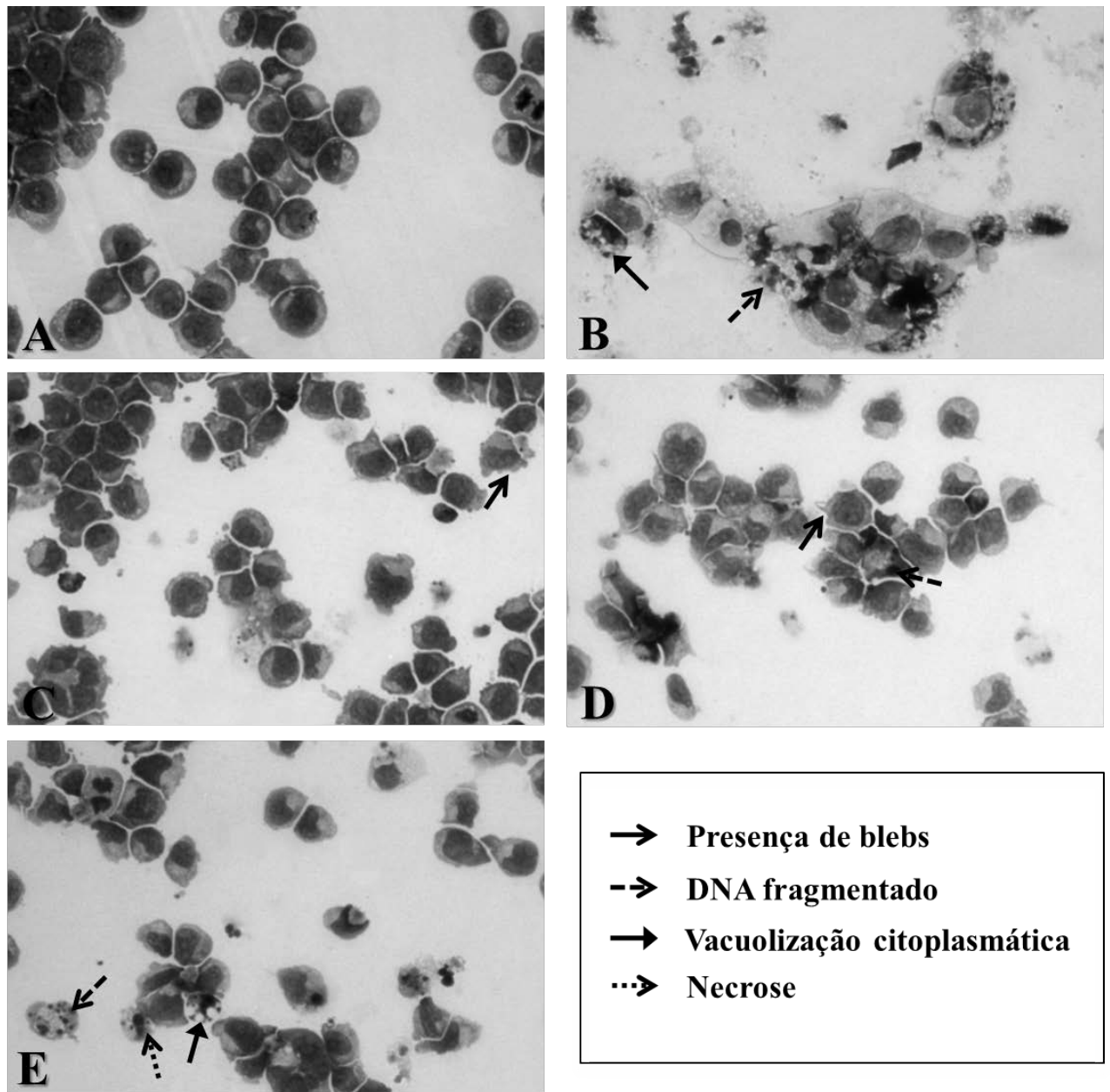


Figura 20 - Microfotografias das células HL-60 controle (A) e tratadas com doxorubicina (B) e com o composto ptilocaulina nas concentrações de 10 μM (C), 15 μM (D) e 20 μM (E) por 24 horas de incubação. Coloração por May-Grunwald-Giemsa – setas cavadas e tracejadas indicam fragmentação nuclear e condensação de cromatina, as cavadas cheias indicam desestabilização da membrana plasmática (presença de blebs), as pretas retas apontam as células com vacuolização citoplasmática e diminuição do volume celular e as setas cavadas e pontilhadas, as picnóticas. Aumento 400X.

4.5.5. Citometria de fluxo

4.5.5.1. Densidade celular

O composto PT diminuiu a concentração de células em todas as concentrações testadas não havendo diferenças significativas entre as diferentes concentrações do alcalóide guanidínico.

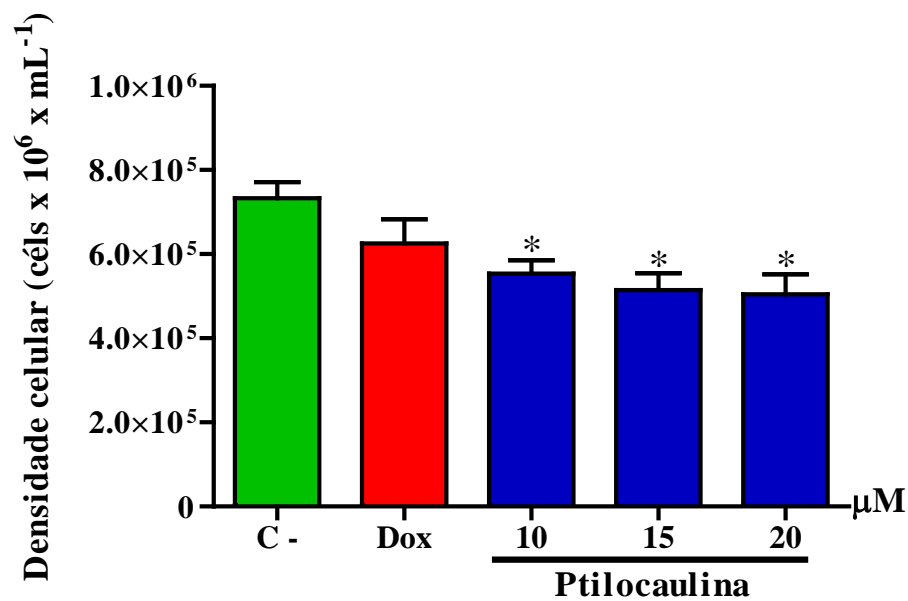


Figura 21 - Efeito do alcalóide guanidínico PT nas concentrações de 10, 15 e 20 μM sobre a densidade celular de linhagem leucêmica (HL-60), analisado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação. C: controle negativo; D: Doxorubicina (0,55μM) foi usada como controle positivo. Os dados correspondem à média ± E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. *, $p < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

4.5.5.2. Integridade de membrana

O composto PT quando incubado por 24 horas em células da linhagem leucêmica HL-60 nas concentrações 10, 15 e 20 μM mostrou uma diminuição significativa da integridade da membrana plasmática das células apenas na maior concentração testada.

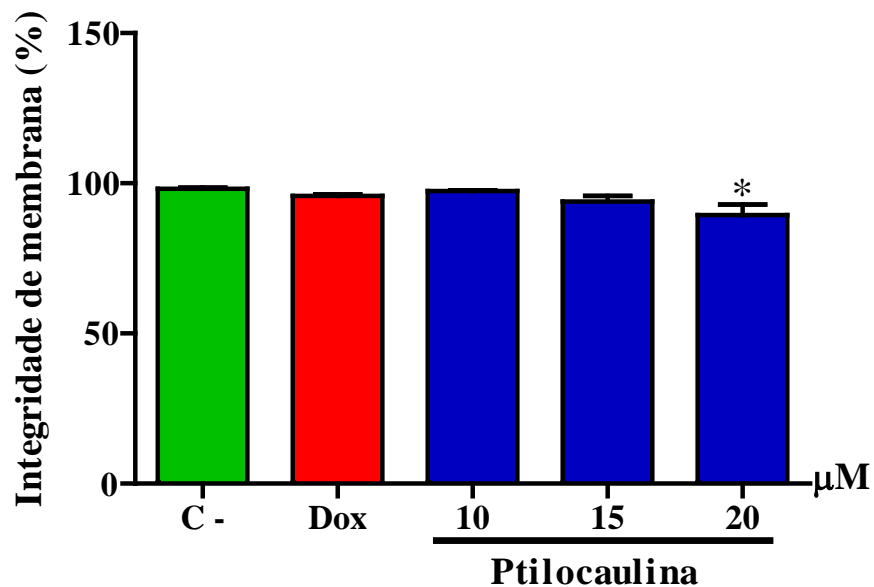


Figura 22 - Efeito do composto PT nas concentrações de 10, 15 e 20 μM sobre a viabilidade (integridade de membrana) de células leucêmicas de HL-60, analisado por citometria de fluxo, após 24 horas de incubação. C: controle negativo; D: Doxorubicina (0,55 μM) foi usada como controle positivo. Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. *, $p < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

4.5.5.3. Análise de ciclo celular

O alcalóide guanidínico PT alterou as fases do ciclo celular da linhagem HL-60 quando incubado por 24 horas. O composto nas concentrações 15 e 20 μ M gerou um significativo aumento do número de células em fase G₀/G₁ e nas mesmas concentrações causaram uma significativa diminuição da fase S do ciclo celular das células tratadas. No entanto não foi observado alterações na fase G₂/M do ciclo celular pelo composto em nenhuma das concentrações testadas.

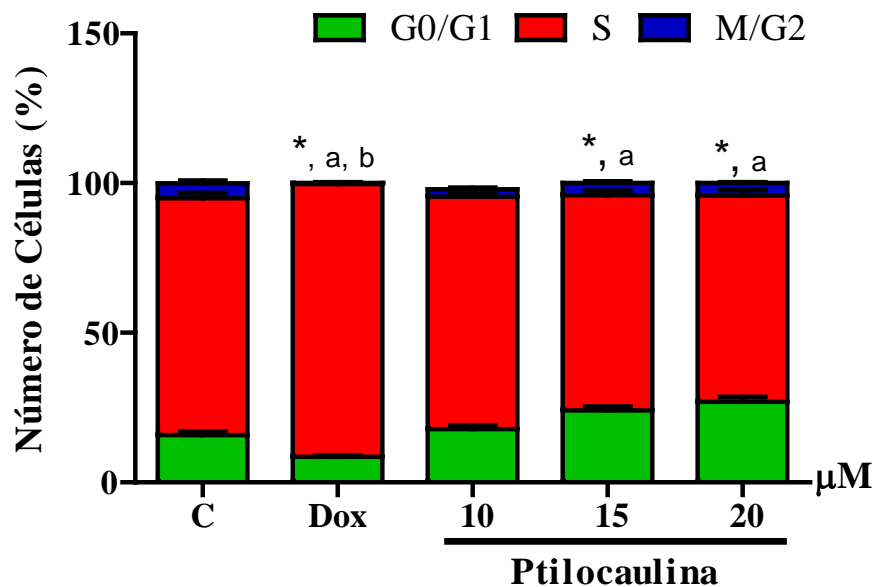


Figura 23 – Ação do composto PT sobre as fases do ciclo celular em células de linhagem leucêmica (HL-60), após 24 horas de incubação, analisadas por citometria de fluxo. C: controle negativo; D: Doxorubicina (0,55 μ M) foi usada como controle positivo. Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. * - significância para G₀/G₁, a – significância para S e b – significância para M/G₂, $p < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

4.5.5.4. Análise de fragmentação do DNA

O alcalóide guanidínico PT aumentou o percentual de células com DNA fragmentado nas concentrações de 15 e 20 μM de forma semelhante.

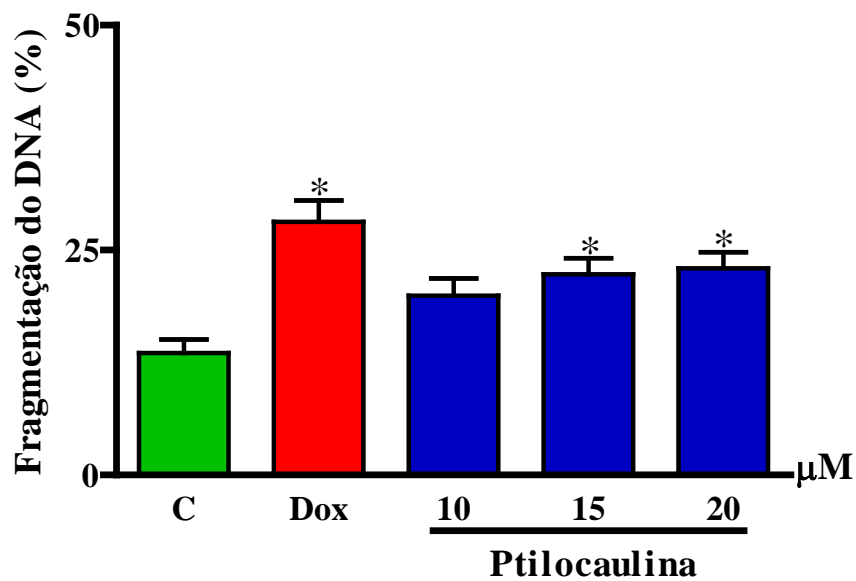


Figura 24 - Efeito do composto PT nas concentrações 10, 15, 20 μM , após 24 horas de incubação, sobre a fragmentação de DNA de células de linhagem leucêmica (HL-60), analisado por citometria de fluxo. C: controle negativo; D: Doxorubicina (0,55 μM) foi usada como controle positivo. Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. *, $p < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

4.5.5.5. Avaliação do Potencial transmembrânico mitocondrial

O alcalóide PT nas concentrações de 15 e 20 μ M quando incubado com células da linhagem leucêmica (HL-60) por 24 horas promoveu a despolarização das mitocôndrias.

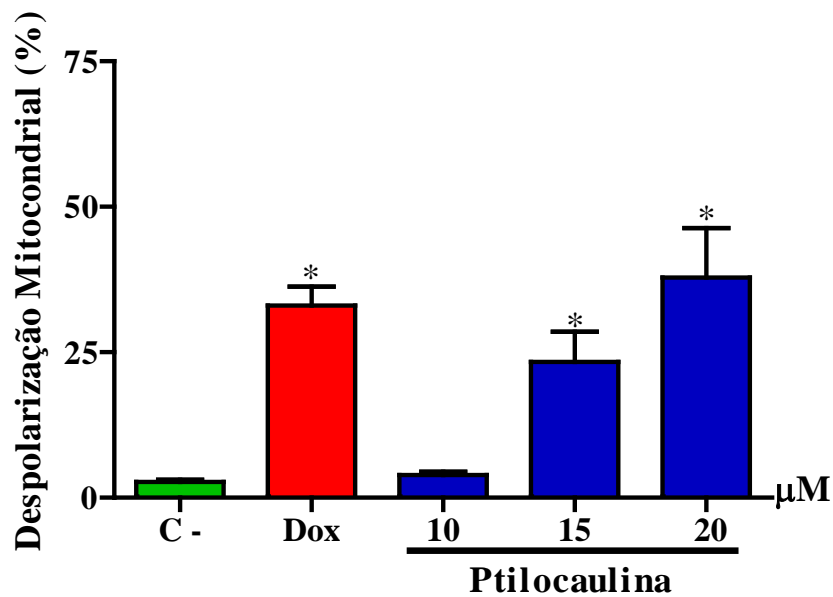


Figura 25 - Efeito do alcalóide PT nas concentrações de 10, 15 e 20 μ M, após 24 horas de incubação, sobre o potencial transmembrânico mitocondrial de células de linhagem leucêmica (HL-60), analisado por citometria de fluxo utilizando rodamina 123. C: controle negativo; D: Doxorubicina (0,55 μ M) foi usada como controle positivo. Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. *, $p < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

5. DISCUSSÃO

A prospecção de compostos bioativos com aplicação terapêutica no ambiente marinho é uma área de pesquisa relativamente recente, contudo já tem mostrado resultados bastante promissores. Os estudos com organismos marinhos coletados no litoral cearense visando à prospecção de substâncias bioativas são ainda incipientes, mas já ressaltam o potencial anticâncer de esponjas, cnidários e ascídias, além de revelar o alto grau de endemismo desses grupos de invertebrados da região (Jimeno *et al.*, 2004; Jimenez *et al.*, 2008; Wilke, 2009; Costa-Lotufo *et al.*, 2009)

As esponjas merecem ênfase por serem os principais detentores de compostos nitrogenados quando comparados aos outros filos que ocupam o ambiente marinho. Esses compostos são oriundos do metabolismo secundário e estão associados à atividade biológica, dentre elas merece destaque a atividade citotóxica. Os estudos de determinação de citotoxicidade *in vitro* são uma eficiente ferramenta para a descoberta de novas moléculas com potencial antitumoral (Cragg & Newman, 2000; Urban *et al.*, 2000).

O primeiro registro de bioatividade em extratos de esponjas marinhas da costa do Ceará foi um estudo realizado por Jimenez e colaboradores (2004) que avaliou o potencial citotóxico, antimitótico e antimicrobiano de extratos hidro-metanólicos obtidos de 8 espécies de esponja coletadas na zona intertidal da praia de fleixeiras, Ceará (Trairi), onde destacou que das 8 espécies estudadas 7 apresentavam algum tipo de atividade biológica, sendo a inibição do desenvolvimento embrionário de ovos de ouriço-do-mar e a atividade antiproliferativa de células tumorais mais frequentemente observadas. O extrato obtido da esponja *Amphimedon* sp. apresentou-se como sendo o mais ativo inibindo o crescimento bacteriano com mínima concentração inibitória (MIC) de 0,15mg/mL, o desenvolvimento embrionário de ovos de ouriço-do-mar, e a proliferação de células tumorais com CI₅₀ variando de 2,8 a 31,9 µg/mL (Jimenez *et al.*, 2004).

Num estudo posterior, Ferreira e colaboradores (2007) realizaram um *screening* dos extratos hidroalcoólicos obtidos de 22 esponjas marinhas, coletadas no Parque Estadual Marinho Pedra da Risca do Meio, na costa cearense, avaliando o potencial citotóxico em células tumorais, hemolítico em eritrócitos de camundongos e antimitótico em ovos de

ouriço-do-mar (*Lytechinus variegatus*). Os extratos obtidos de seis espécies mostraram-se promissores quanto ao seu potencial citotóxico inibindo a proliferação de quatro linhagens de células tumorais testadas (HL-60, MDA-MB-435, HCT-8, SF-295), onde se destacaram as esponjas *Monanchora arbuscula*, *Amphimedon compressa* e *Geodia corticostylifera*, apresentando potente capacidade inibitória do crescimento celular tumoral com CI_{50} variando entre 1,601 a 2,032 $\mu\text{g/mL}$ para a espécie *M. arbuscula*, 1,596 a 2,962 $\mu\text{g/mL}$ para a esponja *Amphimedon compressa* e menor que 1,56 $\mu\text{g/mL}$ para a espécie *Geodia corticostylifera*. Além disso, os extratos obtidos das espécies *Agelas clathrodes*, *Agelas sp.*, *Dictyonella sp.* e *Hyattella intestinalis* apresentaram uma moderada atividade citotóxica nas linhagens celulares testadas. Dos extratos testados quanto à capacidade de causar dano em membrana plasmática de eritrócitos murinos, destacaram-se as espécies *M. arbuscula* e *G. corticostylifera* com concentrações efetivas médias (CE_{50}) de 37,54 $\mu\text{g/mL}$ e 55,10 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, contudo estas concentrações apresentam-se bastante superior as encontradas para a atividade citotóxica (Ferreira *et al.*, 2007).

A inibição do desenvolvimento embrionário em ovos de ouriço-do-mar foi mais pronunciada para os extratos obtidos das espécies *M. arbuscula*, *A. compressa*, *Agelas dispar*, *A. clathrodes*, *Agelas sp.*, *Aplysina sp.*, *Aiolochroia crassa*, *Ircinia strobilina* e *Hyattella intestinalis* apresentando maior efeito inibitório da divisão celular na concentração de $\mu\text{g/mL}$. Enquanto que os extratos das espécies *Niphates sp.*, *Pseudosuberites sp.n.* e *Dragmacidon reticulatus* apresentaram pouca ou nenhuma atividade quando testados na mesma concentração (Ferreira *et al.*, 2007).

Tendo em vista os resultados promissores encontrados para o extrato hidroalcoólico da espécie *M. arbuscula* coletada no Parque Estadual Marinho Pedra da Risca do Meio, Ceará, decidiu-se investigar a composição química dos compostos obtidos do extrato em ensaios bioguiados para avaliação da atividade citotóxica em quatro linhagens de células tumorais.

Das frações oriundas da partição do extrato bruto com solventes orgânicos, as frações com polaridades intermediárias, diclorometano e acetato de etila, se destacaram quanto à capacidade de inibir o crescimento celular em linhagens tumorais. Estas frações quando comparadas por CCD, mostraram-se semelhantes quimicamente. Vale destacar que, estudos realizados por nosso grupo de pesquisa têm mostrado que as frações de polaridade intermediária obtidos de extratos hidroalcoólicos de invertebrados marinhos guiados pela

atividade citotóxica são freqüentemente as mais promissoras (Wilke, 2009; Jimenez *et al.*, 2008). O fracionamento bioguiado pela atividade citotóxica dessas frações levaram ao isolamento de cinco alcalóides guanidínicos, sendo três na forma purificada, mirabilina (1), 8b-hidroxiptilocaulina (2), ptilocaulina (3), e dois epímeros em mistura, 1,8a,8b,3a-dideidro-8 β -hidroxiptilocaulina (4) e 1,8a,8b,3a-dideidro-8 α -hidroxiptilocaulina (5).

Moléculas dessa classe química são reconhecidas por apresentar uma elevada heterogeneidade estrutural e pelo seu amplo espectro de atividade biológica, como a citotoxicidade, atividade antimicrobiana, antiviral, antifúngica, antimalárica, antiprotozoária e bloqueadora de canais de Na⁺ e Ca²⁺. Dessa forma os alcalóides guanidínicos estimulam o interesse pela pesquisa da área biomédica (Maragelman, McKee & McMahan, 2004).

A avaliação da citotoxicidade dos alcalóides isolados da esponja marinha *M. arbuscula* aqui estudada foi realizada através do ensaio do MTT, em quatro linhagens tumorais humanas: leucemia (HL-60), melanoma (MDA-MB-435), carcinoma de cólon (HCT-8) e glioblastoma. (SF-295) (tabela 2). Vale salientar que o ensaio do MTT é uma ferramenta muito importante no estudo de bioprospecção de compostos citotóxicos, a fim de revelar compostos que apresentem, em alguma instância, efeito antiproliferativo (Fornelli *et al.*, 2004).

Dos alcalóides isolados e testados para bioatividade, os compostos 8HPT e PT mostraram-se citotóxicos às células tumorais com CI₅₀ variando de 5,77 a 11,34 μ M, como mostra a tabela 3. Em todas as linhagens, PT apresentou-se ligeiramente mais ativa que 8HPT. Estes compostos apresentam cadeia carbônica bastante semelhante. Os compostos ativos apresentam insaturação entre os carbonos 8 e 8a, contudo o composto 8HPT diferencia-se de PT por apresentar uma hidroxila no carbono 8b, sugerindo menor atividade citotóxica ao composto (figura 16). Os compostos mirabilina B, e a mistura de epímeros composta por 1,8a,8b,3a-dideidro-8 β -hidroxiptilocaulina e 1,8a,8b,3a-dideidro-8 α -hidroxiptilocaulina não possuem a insaturação apresentada pelos compostos 8HPT e PT entre os carbonos 8 e 8a, além disso, a presença da dupla ligação entre os carbonos, 1 e 8a e 3a e 8b, pode estar relacionada a ausência de citotoxicidade dos compostos para as linhagens testadas.

As netaminas C e D são alcalóides guanidínicos isolados da esponja *Biemna laboutei* e apresentam estruturas químicas bastante semelhantes aos compostos isolados da esponja *M. arbuscula* neste estudo, valendo ressaltar que as netaminas C e D possuem potente

atividade citotóxica contra linhagens de células tumorais variando entre 2,6 e 6,6 μ M, estes valores quando comparados aos resultados encontrados para os alcalóides PT e 8HPT mostram-se bastante semelhantes (Sorek *et al.*, 2006).

A ausência de atividade citotóxica do composto mirabilina B isolado neste trabalho corrobora com os resultados encontrados em um estudo feito por Hua e colaboradores em 2004, relatando que a molécula mirabilina B isolada da espécie *M. unguifera* foi avaliada quanto a sua atividade citotóxica frente a 14 linhagens de células tumorais, antimicrobiana, anti-HIV e antituberculose sem demonstrar atividade, contudo exibiu potente atividade antifúngica contra *Cryptococcus neoformans* com CI_{50} de 7,0 μ g/mL e uma pronunciada atividade antiprozoária contra *Leishmania donovani* com CI_{50} igual a 17,0 μ g/mL (Hua *et al.*, 2004).

Neste mesmo estudo Hua e colaboradores (2004) avaliou a mistura de epímeros composta por 1,8a,8b,3a-dideidro-8 β -hidroxiptilocaulina e o seu isômero 1,8a,8b,3a-dideidro-8 α -hidroxiptilocaulina, o qual apresentou atividade contra o protozoário causador de malária, *Plasmodium falciparum*, com CI_{50} de 3,8 μ g/mL. Os resultados obtidos neste estudo corroboram com aqueles encontrados no presente trabalho, mostrando que esta mistura de epímeros não apresenta atividade citotóxica em linhagens celulares tumorais.

Ruben e colaboradores (1989) realizaram um estudo para avaliar o potencial citotóxico de uma ptilocaulina sintética racêmica em 14 linhagens de células tumorais humanas e murinas, onde se observou maior atividade citotóxica frente a linhagens leucêmicas e de melanoma, e efeito citotóxico menos pronunciado para células linfóides e de adenocarcinoma de cólon humano na avaliação pelo método do MTT. No presente estudo, os compostos 8HPT e PT mostraram-se também mais ativos em linhagens de HL-60 (leucemia) e MDA-MB-435 (melanoma) e menos pronunciada nas linhagens de HCT-8 (carcinoma de cólon) e SF-295 (glioblastoma) (tabela 4).

Vale ressaltar que estudos realizados pelos grupos de Harbour e colaboradores (1981) e Rinehart e colaboradores (1981), demonstraram que o alcalóide ptilocaulina de origem natural apresentou em média CI_{50} de 0,39 e 0,17 μ g/mL, respectivamente, para a linhagem leucêmica murina L1210. Para esta mesma linhagem, Ruben e colaboradores (1989), em estudo com uma ptilocaulina sintética racêmica obteve CI_{50} média de 0,13 μ g/mL, onde os dados obtidos sugerem que o composto tanto natural quanto sintético apresentam

semelhança quanto ao potencial citotóxico. Os dados obtidos no presente trabalho, apesar de apresentar resultados de CI_{50} (1,1 $\mu\text{g/mL}$) superiores aos encontrados em pesquisas anteriores, entretanto nosso estudo mostrou o perfil de citotoxicidade da ptilocaulina natural em linhagens de células humanas, enquanto estudos anteriores descreveram atividade do mesmo composto em linhagem celular murina (Harbour *et al.*, 1981; Rinehart *et al.*, 1981; Ruben *et al.*, 1989).

A atividade antiproliferativa dos alcalóides 8HPT e PT em células mononucleadas do sangue periférico (PBMC) também foi investigada através do teste Alamar Blue após 72h de incubação. Neste ensaio, os compostos não causaram inibição da proliferação destas células sugerindo, ou seletividade destas moléculas por células tumorais ou por células com taxa de proliferação mais elevada (tabela 4).

Outro ensaio para avaliação da atividade dos compostos 8HPT e PT foi o teste de atividade hemolítica, para avaliar dano à membrana plasmática de eritrócitos isolados de comundongos *Mus musculus* (Swiss), que segundo Costa-Lotufo *et al.* (2002) atribui a capacidade das substâncias em causar lesões na membrana plasmática da célula, seja pela formação de poros ou pela ruptura total. Os compostos exibiram concentrações efetivas (CE_{50}) de 577.9 e 352.9 μM , respectivamente. É importante ressaltar que o efeito hemolítico observado foi em concentrações bastante superiores às determinadas pelo ensaio do MTT.

A avaliação dos possíveis mecanismos de ação do composto PT foi realizada utilizando como modelo a linhagem leucêmica promielocítica humana (HL-60), que se mostrou a mais sensível aos efeitos antiproliferativos deste composto.

Para avaliar o efeito sobre a viabilidade celular, o composto PT, foi submetido ao ensaio de exclusão pelo azul de tripan. O composto reduziu significativamente o número de células viáveis em todas as concentrações testadas, sendo observado aumento no número de células não viáveis apenas na maior concentração testada (20 μM) (figura 17), indicando uma reduzida incidência de morte celular por necrose nas menores concentrações. De forma semelhante, Ruben e colaboradores (1989) ressaltaram uma diminuição da viabilidade das células tumorais MCF-7 e B16F10, utilizando o mesmo ensaio, após um período de 72 horas de incubação com a ptilocaulina sintética racêmica, entretanto, os resultados encontrados em nosso estudo com uma ptilocaulina natural observou-se uma diminuição na linhagem tumoral humana HL-60 já com 24 horas de exposição ao composto.

A fim de se determinar o mecanismo envolvido na atividade antiproliferativa observada no ensaio do MTT pelo alcalóide PT sob as células tumorais, foi realizado o ensaio de inibição da síntese de DNA. A redução do número das células HL-60 marcadas positivo para BrDU foi significativa em todas as concentrações testadas de PT, sendo que a incorporação de BrDU no núcleo das células está relacionada a síntese de DNA e, conseqüentemente, à proliferação celular. A redução da proliferação celular induzida por PT foi de maneira concentração dependente, e, ao tratamento com 20 μM , a incorporação de BrDU foi reduzida à aproximadamente 1/3 daquela das células não tratadas, semelhantemente ao efeito observado para o controle positivo, doxorrubicina (0,55 μM).

Variolina B, um alcalóide guanidínico obtido da esponja marinha *Kirkpatrickia variolosa*, coletada na Antártica, causou diminuição na proliferação celular de células K562 e, mais evidentemente, em Jurkat, duas células de linhagem leucêmica. As concentrações de 0,1, 0,25 e 0,5 μM foram efetivas para Jurkat, ao passo que K562 foi sensível apenas à concentração mais alta. Para Jurkat, a concentração de 0,5 μM reduziu a proliferação celular para 40% daquela do controle (Simone *et al.*, 2005).

A variolina B foi testada quanto ao seu efeito na divisão celular de células LoVo. Para as células na fase G1, o tratamento com variolina B preveniu a entrada na fase S, quando é realizada a síntese de DNA, de modo que, após 8h de tratamento com 0,9 μM , 79% das células ainda encontravam-se em G1. Contudo, 15h após o início do tratamento, 70% destas células já estavam na fase S. As células que se encontravam na fase S no início do tratamento com variolina B apresentaram um atraso na progressão para a fase seguinte, efeito este que já se fazia evidente com 4h de exposição a 0,9 μM do composto. Entretanto, após 15h de tratamento, poucas células ainda estavam na fase S (10%) ou G2/M (18%), e a grande maioria delas (os 72% restantes) encontrava-se na fase G1 (Simone *et al.*, 2005).

No presente estudo, o tratamento de células HL-60 com 15 ou 20 μM de PT induziu um ligeiro, mas significativo aumento do número de células na fase G1 após 24h de exposição, e um decréscimo das células em S, o que pode ser relacionado com o retardo dessas células para entrar na fase S devido ao bloqueio de uma enzima relevante, ao desequilíbrio bioquímico intercelular ou ao processo de morte celular já iniciado a esta altura do tratamento. Esses resultados corroboram com os encontrados para o ensaio do BrDU, onde a redução das células na fase de síntese de DNA também foi observado.

Em revisão recente elaborada por Nakao & Fusetani (2007) sobre inibidores enzimáticos obtidos de organismos marinhos, metabólitos secundários guanidínicos foram efetivos contra diversos tipos enzimáticos, a saber, geranyl-geranyltransferase tipo I, receptor epidermal de fatores de crescimento, checkpoint quinases, quinases dependentes de ciclinas, fosfatases protéicas 1 e 2A, fosfolipase A2, fosfodiesterases, quitinases e serina e cisteína proteases.

Alterações morfológicas celulares avaliadas pela coloração em May-Grunwald-Giemsa e BE/LA foram investigadas com o intuito de determinar qual mecanismo de morte celular envolvido com o potencial citotóxico da ptilocaulina. A análise morfológica utilizando a coloração May-Grunwald-Giemsa (figura 20) mostrou que as células tratadas com o alcalóide nas concentrações de 10, 15 e 20 μ M apresentaram alterações morfológicas nas células incluindo a presença de prolongamentos da membrana plasmática (blebs), vacuolização citoplasmática, picnose nuclear e fragmentação de DNA, além de diminuição do volume celular principalmente nas maiores concentrações testadas (15 e 20 μ M). Tais eventos são características estruturais relacionados à morte celular por apoptose. A avaliação pelo ensaio de Brometo de etídio/ Laranja de acridina (BE/LA) (figura 22) mostrou que a ptilocaulina induziu o aumento do número de células em apoptose seguido de uma diminuição das células viáveis para todas as concentrações testadas e de modo concentração dependente, sem promover o aumento no número de células em necrose, reforçando as observações anteriores.

Nesse contexto, mudanças morfológicas nas células, como a condensação e fragmentação nucleares, conseqüentemente, do próprio DNA, sugerem mecanismos de indução de morte por apoptose. Com a finalidade de verificar o potencial do alcalóide PT em causar morte por apoptose nas células tumorais foram utilizadas técnicas de citometria de fluxo.

O alcalóide ptilocaulina induziu a perda da integridade de membrana celular apenas na concentração de 20 μ M (figura 22), além disso, evidenciou-se diminuição no número de células em todas as concentrações testadas, estes resultados ressaltam o que foi observado nos ensaios de exclusão de tripan e BE/LA. O aumento de células não viáveis observados pelo ensaio de exclusão do azul de tripan seguido da perda da integridade de membrana para o composto na maior concentração testada reforça a idéia de morte por apoptose, um processo que provavelmente é acelerado quando se aumenta a concentração de

PT no meio, indicando um ponto onde o processo de apoptose é visto num ponto mais tardio do seu desenvolvimento, evidenciado pela perda da integridade de membrana.

Além disso, nas mesmas concentrações, pôde-se verificar a despolarização da mitocôndria (figura 25). Os eventos observados pelos ensaios em citometria de fluxo como a fragmentação do DNA e despolarização mitocondrial, sem causar dano à membrana plasmática são característicos de morte celular por apoptose.

O alcalóide guanidínico pteroginidina isolado das folhas de *Alchornea glandulosa* quando incubado por 24 horas com células da linhagem HUVEC (células endoteliais de cordão umbilical humano) promoveu uma redução de 63% da viabilidade celular observado pelo ensaio do MTT para concentração de 8 μ M. Nesta mesma concentração, o composto quando avaliado através do método do BrDU quanto ao seu potencial antiproliferativo apresentou uma significativa diminuição da proliferação celular, seguido por um acréscimo do percentual de células em apoptose visto pelo ensaio do tunel (Lopes *et al.*, 2009). Os resultados acima descritos corroboram com os resultados achados neste trabalho.

A variolina B também foi capaz de induzir apoptose em células leucêmicas das linhagens Jurkat e K562. Nas células Jurkat tratadas com 0,1 a 0,5 μ M, sinais de apoptose já apareciam logo nas primeiras horas de tratamento. Células apoptóticas surgiram após 4h de tratamento e aumentaram em número com o tempo de exposição, avaliadas em citômetro de fluxo pelo método de Anexina-V. (Em tempo, a anexina-V é uma sonda fluorescente que se liga a fosfatidilserina, um fosfolípídeo de membrana que, à entrada da célula em apoptose, é externalizada). Mais além, alterações morfológicas relacionadas a apoptose, tais que condensação da cromatina e surgimento de corpos apoptóticos foram observadas para células Jurkat tratada com variolina B (Simone *et al.*, 2005).

O presente trabalho mostra que a esponja *M. arbuscula* coletada na costa do Ceará, é uma rica fonte de alcalóides guanidínicos com atividade biológica. Além disso, está demonstrado a atividade citotóxica dos compostos 8b-hidroxiptilocaulina e ptilocaulina e reforça a seletividade dessa substância para células tumorais, ao passo que esclarece um pouco do mecanismo de ação, tendo como fundamentação as evidências de indução de apoptose em células HL-60 tratadas com PT.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo isolou, identificou e caracterizou por seu potencial citotóxico 5 alcalóides guanidínicos a partir do extrato alcoólico da esponja marinha *Monanchora arbuscula*, revelando o composto ptilocaulina com significante citotóxicidade contra células tumorais *in vitro*, atuando como um potente indutor de apoptose celular em células da linhagem HL-60.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSEN, R.J. & WILLIAMS, D.E. Pharmaceuticals from the sea In. HESTER, R.E. & HARRISON, R.M. **Chemistry in the Marine Environment**. 13.ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2000, cap. 4, p. 55-80.

BECERRO, M.A.; TURON, X.; URIZ, M.J. Multiple functions for secondary metabolites in encrusting marine invertebrates. **Journal of Chemical Ecology**, v. 23, p. 1527-1547, 1997.

BELARBI, E.H.; GÓMEZ, A.C., CHISTI, Y.; CAMACHO, F.G.; GRIMA, E.M. Producing drugs from marine sponges. **Biotechnology Advances**, v. 21, p. 585-598, 2003.

BERGMAN, W. & FEENEY, R.J. Nucleosides of sponges. **Journal of Organic Chemistry**, v.16, p.981-987, 1951.

BERLINCK, R.G.S.; BRAEKMAN, J.C.; DALOZE, D. Polycyclic guanidine alkaloids from the marine sponge *Crambe crambe* and Ca⁺⁺ channel blocker activity of crambescidin 816. **Journal of Natural Products**, v. 56 (7), p. 1007- 1015, 2003.

BERLINCK, R.G.S.; BURTOLOSO, A.C.B.; KOSSUGA, M.H. The chemistry and biology of organic guanidine derivatives. **Natural Products Report**, v. 25, p. 919–954, 2008.

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

BRAEKMAN, J.C. & DALOZE, D. Chemical and biological aspects of sponge secondary metabolites. **Phytochemistry Reviews**, v. 3, p. 275-283, 2004.

BRUSCA, R.C. & BRUSCA, G.J. Filo Porífera: As esponjas. In. BRUSCA, R.C. & BRUSCA, G.J. **Invertebrados**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2005. cap. 6 , p. 185-216.

BURKHARD, H. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. **Drug Discovery Today**, V.8, p.536-544, 2003.

CHANG, L.C.; WHITTAKER, N.F.; BEWLEY, C.A.; Crambescidin 826 and Dehydrocrambine A: New polycyclic guanidine alkaloids from the marine sponge

Monanchora sp. that inhibit HIV-1 fusion. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1490-1494, 2003.

COSTA-LOTUFO, L. V.; WILKE, D. V.; JIMENEZ, P. C.; EPIFANIO, R.E. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: histórico & perspectivas. **Química Nova**, v.32, p.703-716, 2009.

Cury-Boaventura, M.F.; Pompeia, C.; Curi, R. Comparative toxicity of oleic acid and linoleic acid on Jurkat cells. **Clinical Nutrition** , v. 23, p. 721–732, 2004.

DELLE MONACHE, G.; BOTTA, B.; DELLE MONACHE, F.; ESPINAL, R.; DE BONNEVAUX, S.C.; DE LUCA, C.; BOTTA, M.; DEI, F.C.D.; GACS-BAITZ, E.; CARMIGNANI, M. Caracasandiamide, a truxinic hypotensive agent from *Verbesina caracasana*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 6, p. 233-238, 1996.

DONIA, M. & HAMANN, M. T. Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. **The Lancet Infectious Diseases**, v.3, p.338-348, 2003.

ELAN – www.elan.com, acessada em Dezembro de 2009.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY – www.ema.europa.eu, acessada em Dezembro de 2009.

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

FERREIRA, E.G.; WILKE, D.V.; JIMENEZ, P.C.; PORTELA, T.A.; HAJDU, E.; PESSOA, C.O.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V. Cytotoxic activity of hydroethanolic extracts of sponges (Porifera) collected at Pedra da Risca do Meio State Park, Ceará State, Brazil. **Porifera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability**, v.2, p.313-318, 2007.

FORNELLI, F., MINERVINI, F., LOGRIECO, A., A Cytotoxicity of fungal metabolites to lepidopteran (*Spodoptera frugiperda*) cell line (SF-9). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 85, p. 74-79, 2004.

GENG, C.X.; ZENG, Z.C.; WANG, J.Y. Docetaxel inhibits SMMC-7721 human hepatocellular carcinoma cells growth and induces apoptosis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 9, p. 696-700, 2003.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v.100, p.57-70, 2000.

HARBOUR, G.C.; TYMIAK, A.A.; RINEHART, JR. K.L.; SHAW, P.D.; HUGHES, JR. R.G.; MIZSAK, S.A.; COATS, J.H.; ZURENKO, G.E.; LI, L.H.; KUENTZEL, S.L. Ptilocaulin and isoptilocaulin, antimicrobial and cytotoxic cyclic guanidines from the Caribbean sponge *Ptilocaulis* aff. *P. spiculifer* (Lamarck, 1814). **Journal of the American Chemical Society**, v. 103, p. 5604-5606, 1981.

HEYS, I.; MOORE, C.G.; MURPHY, P.J. The guanidine metabolites of *Ptilocaulis spiculifer* and related compounds; isolation and synthesis. **Chemical Society Reviews**. v. 29, p. 57-67, 2000.

HUA, HUI-MING, PENG, J., FRONCZEC. F.R., KELLY, M. HAMANN, M.T. Crystallographic and NMR studies of antiinfective tricyclic guanidine alkaloids from the sponge *Monanchora unguifera*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.12, p.6461-6464, 2004.

HUA, HUI-MING; PENG, J.; DUNBAR, D.C.; SCHINAZI, R.F.; ANDREWS, A.G.C.; CUEVAS, C.; GARCIA-FERNANDEZ, L.F.; KELLY, M.; HAMANN, M.T. Batzelladine alkaloids from the caribbean sponge *Monanchora unguifera* and the significant activities against HIV-1 and AIDS opportunistic infectious pathogens . **Tetrahedron**, v. 63, p. 11179-11188, 2007.

JIMENEZ, P. C.; TEIXEIRA, G. L. S.; WILKE, D.V; NOGUEIRA, N. A. P.; HAJDU, E.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L.V. Cytotoxic and antimicrobial activities of hydro-methanolic extracts of sponges (porifera) from Ceará state, Brazil. **Arquivos de Ciências do Mar**, v.37, p.85-91, 2004.

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

JIMENEZ, P.C. **Estaurosporinas de *Eudistoma vanammei*: Química e bioatividade**. 2009. 150f. Tese (Doutorado em farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Ceará.

JIMENO, J, FAIRCLOTH, G., SOUSA-FARO, J.M.F., SCHEUER, P., RINEHART, K. New marine derived anticancer therapeutics – A journey from the sea to clinical trials. **Marine Drugs**, v.2, p.14-19, 2004.

KASHMAN, Y.; HIRSH, S.; McCONNELL, O.; OHTANI, I.; KUSUMI, T.; KAKISAWA, H. Ptilomycalin A: a novel polycyclic guanidine alkaloid of marine origin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 111, p. 8925-8926, 1989.

KOSSUGA, M.H.; LIRA, S.P.; NASCIMENTO, A.M.; GAMBARDELLA, M.T.P.; BERLINCK, R.G.S.; TORRES, Y.R.; NASCIMENTO, G.G.F.; PIMENTA, E.F.; SILVA, M.; THIEMANN, O.H.; OLIVA, G.; TEMPONE, A.G.; MELHEM, M.S.C.; SOUZA, A.O.; GALETTI, F.C.S.; SILVA, C.L.; CAVALCANTI, B.; PESSOA, C.O.; MORAES, M.O.; HAJDU, E.; PEIXINHO, S.; ROCHA, R.M. Isolamento e atividades biológicas de produtos naturais das esponjas *Monanchora arbuscula*, *Aplysina* sp., *Petromica ciocalyptoides* e *Topsentia ophiraphidites*, da ascídia *Didemnum ligulum* e do octocoral *Carijoa riisei*. **Química Nova**, v.30 (5), p.1194-1202, 2007.

LAVILLE, R.; THOMAS, O.P.; BERRUÉ, F.; MARQUEZ, D.; VACELET, J.; AMADE, P. Bioactive guanidine alkaloids from tow Caribbean marine sponges. **Journal of Natural Products**, v. 72, p. 1589-1594, 2009.

LAZARO, J.E.H.; NIRCHEU, J.; MAHMOUDI, N.; IBANA, J.A.; MANGALINDAN, G.C.; BLACK, G.P.; HOWARD-JONES, A.G.; MOORE, C.G.; THOMAS, D.A.; MAZIER, D.; IRELAND, C.M.; CONCEPCION, G.P.; MURPHY, P.J.; DIQUET, B. Antimalarial activity of crambescidin 800 and synthetic analogues against liver and blood stage of *Plasmodium* sp. *The Journal of Antibiotics*, v. 59 (9), p. 583-590, 2006.

LOPES, F.C.M.; ROCHA, A.; PIRRACO, A.; REGASINI, L.O.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; AZEVEDO, I.; CARLOS, I.Z.; SOARES, R. Anti-angiogenic effects of pterogynidine alkaloid isolated from *Alchornea gladulosa*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 9 (15), p. 1-11, 2009.

MARAGELMAN, K.M.; McKEE, T.C.; McMAHON, J.B. Monanchorin, a bicyclic alkaloid from the sponge *Monanchora unguiculata*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1165-1167, 2004.

MAYER, A. M. S. & GUSTAFSON, K. R. Marine pharmacology in 2005-2006: Antitumour and cytotoxic compounds. **European Journal of Câncer**, v. 44 (16), p. 2357-2387, 2008.

MAYER, A.M.S.; RODRÍGUEZ, A.D.; BERLINCK, R.G.S.; HAMANN, M.T. Marine pharmacology in 2005–6: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.5, p. 283-308, 2009.

McCLINTOCK, J.B. & BAKER, B.J. **Marine Chemical Ecology**. Nova York: Marine Science Series, 2001, pp. 610.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.16, p.55–63, 1983.

MURICY, G.; HAJDU, E.; ARAUJO, F.V.; HAGLER, A.N. Antimicrobial activity of Southwestern Atlantic shallow-water marine sponges (Porifera). **Scientia Marina**, v. 57 (4), p. 427-432, 1993.

NAGLE, D.G.; ZHOU, Y-D. ; MORA, F.D.; MOHAMMED, K.A.; KIM, Y-P. Mechanism targeted discovery of antitumor marine natural products. **Current Medicinal Chemistry**. V. 11, p. 1725-1756, 2004.

NEREUS PHARMACEUTICALS - <http://www.nereuspharm.com>, acessada em janeiro de 2010.

NEWMAN, D. J. & CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 461-477, 2007.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products from marine invertebrates and microbes as modulators of antitumor targets. **Current Drug Targets**, v. 7(3), p. 279-304, 2006.

NEWMANN, D.J. & CRAGG, G.M. Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 1216-1238, 2004.

OHTANI, I.; MOORE, R.E.; RUNNEGAR, M.T.C. Cylindrospermopsin: a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Journal American Chemical Society**, v. 114, p. 7941– 7942, 1992.

PERA, F.; MATTIAS, P.; DETZER, K. Methods for determining the proliferation kinetics of cells by means of 5-bromodeoxyuridine. **Cell Tissue Kinetics**, v. 10, p. 255–264, 1977.

PHARMAMAR - <http://www.pharmamar.com>, acessada em Janeiro de 2010

PONCET, J. The dolastatins, a family of promising antineoplastic agents. **Current pharmaceutical design**, v. 5:p. 139-162, 1999.

PROKSCH, P.; EDRADA, R. A.; EBEL, R. Drugs from the seas – current status and microbiological implications. **Applied microbiology and biotechnology**, v.59, p.125-134, 2002.

RADITSCH, M.; GEYER, M.; KALBITZER, H. R.; JAHN, W.; RUPPERSBERG, P.; WITZEMANN, V. (1996) Polyamine Spider Toxins and Mammalian N-methyl-D-aspartate Receptors. Structural Basis for Channel Blocking and Binding of Argiotoxin 636 . **European Journal of Biochemistry**, v. 240, p. 416-426, 1996 .

REGASINI, L.O.; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D.H.; FURLAN, M.; BARREIRO, E.J.; FERREIRA, P.M.; PESSOA, C.; LOTUFO, L.V.; MORAES, M.O.; YOUNG, M.C.; BOLZANI, V.D. Cytotoxic Guanidine Alkaloids from *Pterogyne niten*. **Journal of Natural Products**, v. 72 (3), p. 473-476, 2009.

RENZI, D.; VALTOLINA, M.; FOSTER, R. The evaluation of a multiendpoint cytotoxicity assay system. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 21, p. 89–96, 1993.

RINEHART, K.L.J.; SHAW, P.D.; SHIELD L.S.; GLOER J.B.; HARBOUR G.C.; KOKER, M. S.; SAMAIN, D.; SCHWARTZ, R.E.; TYMIAK, A.A.; WELLER, D.L.; CARTER, G.T.; MUNRO, M. H.G.; HUGHES, JR. R.G.; RENIS, H.E.; SWYNENBERG, E.B.; STRINGFELLOW, D.A.; VARVA J. J.; COATS, J.H.; ZURENKO, G.E.; KUENTZEI, S.L.;

LI, L.H.; BAKUS, G.J.; BRUSCA, R.C.; CRAFT, L.L.; YOUNG, D.N.; COUNOR, J.L. Marine natural products as sources of antiviral, antimicrobial and antineoplastic agents. **Pure and Applied Chemistry**, v. 53, p. 795-817, 1981.

ROCHA, A. B.; LOPES, R. M.; SCHWARTSMANN, G. Natural products in anticancer therapy. **Current Opinion in Pharmacology**, v.1, p. 364-369, 2001.

ROVERA, G.; SANTOLI, D.; DAMSKY C. Human promyelocytic leukemia cells in culture differentiate into macrophage-like cells when treated with a phorbol diester. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76 (6) p. 2779-2783, 1979.

RUBEN, R.L.; SNIDER, B.B.; HOBBS Jr. F.W.; CONFALONE, P.N. Cytotoxicity of synthetic racemic ptilocaulin: A novel cyclic guanidine. **Investigational New Drugs**, v.7, p.147-154, 1989.

RUPPERT, E.E. & BARNES, R.B. Esponjas e Placozoários. In. RUPPERT, E.E. & BARNES, R.B. **Zoologia dos Invertebrados**. 7. ed. São Paulo: Roca LTDA, 1996. cap. 3, p. 67-94.

SIMONE, M.; ERBA, E.; DAMIA, G.; VIKHANSKAYA, F.; FRANCESCO, A.M.D.; RICCARDI, R.; BAILY, C.; CUEVAS, C.; SOUSA-FARO, J.M.F.; D'INCALCI, M. Variolin B and its derivative deoxy-variolin B: New marine natural compounds with cyclin-dependent kinase inhibitor activity. **European Journal of Cancer**, v. 41, p. 2366-2377, 2005.

SIPKEMA, D.; FRASSEN, M. C. R.; OSINGA, R., TRAMPER, J.; WIJFFELS, R. H. Marine sponge as pharmacy. **Marine Biotechnology**, v. 7, p. 142-162, 2005.

SOARES-GOMES, A. & FIGUEIREDO, A.G. O ambiente marinho. In.PEREIRA, R.C. & SOARES-GOMES, A. **Biologia Marinha**. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2009. cap. 1, p.1-34.

SOEST, R. W. M. VAN; BRAEKMAN, J. C.; FAULKNER, D. J.; HAJDU, E.; HARPER, M. K.; VACELET, J. The genus *Batzella*: a chemosystematic problem. **Bulletin de L'Institut Royal des Science Naturelles de Belgique**, v.66 suppl., p.89-101, 1996.

SOREK, H.; RUDI, A.; GUETA, S.; REYES, F.; MARTIN, M.J.; AKININ, M.; GAYDOU, E.; VACELET, J.; KASHMAN, Y. Netamines A-G: seven new tricyclic guanidine alkaloids from marine sponge *Biemna laboutei*. *Tetrahedron*, v. 62, p. 8838-8843, 2006.

SPRINGER, J.E.; AZBILL, R.D.; CARLSON, S.L. A rapid and sensitive assay for measuring mitochondrial metabolic activity in isolated neural tissue. **Brain Research Protocols**, v. 2, p. 259-263, 1998.

TAVARES, R.; DALOZE, D.; BRAEKMAN, J.C.; HAJDU, E.; MURICY, G.; VAN SOEST, R.W.M. Isolation os Crambescidin 800 from *Monanchora arbuscula* (Porifera). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 22 (6), p. 645-646, 1994.

TAVARES, R.; DALOZE, D.; BRAEKMAN, J.C.; HAJDU, E.; VAN SOEST, R. W. M. 8b-Hydroxyptilocaulin, a New Guanidine Alkaloid from the Sponge *Monanchora arbuscula*. **Journal of Natural Products**, v.58, issue 7, p.1139-1142, 1995.

THAKUR, N.L. & MÜLLER, W.E. Biotechnological potential of marine sponges. **Current Science**, v. 86 (11), p. 1506-1512, 2004.

URBAN, S.; HICKFORD, S.J.H.; BLUNT, J.W.; MUNRO, M.H.G. Bioactive marine alkaloids. **Current Organic Chemistry**, v. 4, p. 765-807, 2000.

URIZ, M.J.; TURON, X.; BECERRO, M.A.; GALERA, J. Feeding deterrence in sponges. The role of toxicity, physical defenses, energetic contents, and life-history stage. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 205, p. 187-204, 1996a.

VAN SOEST, R.W.M. Family Cambreidae Lévi, 1963. In Hooper, j.; Soest, R.W.M. **Systema Porifera. A guide to the classification of sponges**, New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, v. 1, p. 547 – 555, pp 1101, 2002.

WILKE, D. V. ; JIMENEZ, PAULA CHRISTINE ; PESSOA, C. ; MORAES, M. O.; ARAUJO, R. M. ; SILVA, W. M. B. ; SILVEIRA, EDILBERTO R ; PESSOA, O. D. L. ; BRAZFILHO, R. ; LOPES, N. P. ; COSTA-LOTUFO, L. V. Cytotoxic lipiidic alpha-amino acids from the zoanthid *Protopalythoa variabilis* from the northeastern coast of Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, nº. 8, p.1455-1459, 2009.

Y. NAKAO, Y. & FUSETANI, N. Enzyme Inhibitors from Marine Invertebrates. *Journal of Natural Products*, v. 70, p. 689–710, 2007.

ZHANG, W.; ZHANG, X.; CAO, X.; XU, J.; ZHAO, Q. ; YU, X. Optimizing the formation of in vitro sponge primmorphs from the Chinese sponge *Stylotella agminata* (Ridley). ***Journal of Biotechnology***, v. 100, p. 161-168, 2003.

ZHI-JUN Y.; SRIRANGANATHAN, N.; VAUGHT, T.; ARASTU, S.K.; ANSAR AHMED, S. A dye-based lymphocyte proliferation assay that permits multiple immunological analyses: mRNA, cytogenetic, apoptosis, and immunophenotyping studies. ***Journal of Immunological Methods***, v. 210, p. 25-39, 1997.

Anexo I

Equipamentos e Soluções

❖ Equipamentos:

EQUIPAMENTOS

Agitador de placa, MLW Modelo Thys 2®
Agitador de tubo, Donner AD 8850®
Banho-maria, DELTA Modelo 105Di®
Centrífuga Centimicro, FANEN Modelo 212®
Centrífuga Excelsa Baby, I FANEN Modelo 206®
Centrífuga de placas, Eppendorf Modelo Centrifuge 5403®
Centrífuga de lâminas, Shandon Southern Cytospin®
Citômetro de fluxo, Guava EasyCyte mini®
Colunas analíticas para CLAE Shimadzu ODS
Colunas preparativas para CLAE Shimadzu ODS
Cromatógrafo líquido Shimadzu com bomba Modelo LC6A
Detector Ultra-Violeta com Integrador Modelo C-R6A
Deonizador de água Milli-Q, Milipore®
Espectrofotômetro de placa DTX-880, Beckman Coulter®
Fluxo laminar, VECO®
High Throughput Screening (HTS)/Laboratory Automation Workstation, Biomek 3000, Beckman Coulter®
Incubadora de células, (CO ₂ Water-Jacket Incubator) NUAIRE TS Autoflow®
Injetor Manual Rheodyne Modelo 7125
Máquina fotográfica digital, Olympus C-7070®
Microscópio óptico, Metrimpex Hungary/PZO-Labimex Modelo Studar lab®
Microscópio óptico de inversão, Nikon Diaphot®
Microscópio de fluorescência, Olympus®
pHmetro, Micronal B474®
Pipetas automáticas, Gilson®
RMN Bruker DPX-300
Agitador de tubo, Donner AD 8850®

❖ Solventes

SOLVENTE	MARCA
Acetato de Etila	Vetec®
Ácido Clorídrico	Vetec®
Álcool Etilico	Vetec®
Álcool Metílico	Vetec®
Diclorometano	Vetec®
Dimetilsulfóxido	Vetec®
Éter de Petróleo	Vetec®
Triton X-100	Isofar®

❖ Cromatografia

FASE ESTACIONÁRIA	MARCA
Sephadex LH-20	Pharmacia
Sílica gel 60 GF ₂₅₄	Merck

❖ Sais

SAL	MARCA
Cloreto de sódio (NaCl)	Vetec®
Sulfato de sódio (Na ₂ SO ₄)	Vetec®
Tris ((HOCH ₂) ₃ CNH ₂)	Vetec®

❖ Soluções

▪ Cultura de células

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

❖ **Ensaio de atividade antiproliferativa**▪ **MTT**

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

▪ **Alamar Blue**

SOLUÇÃO	COMPOSIÇÃO	MARCA
Ficoll	-	Sigma®
Fitohemaglutinina	-	Sigma®
Resazurina	0,312 mg/mL	Sigma®
	H ₂ O Mili-Q estéril	-

❖ **Hemólise**▪ **Solução salina**

SOLUÇÃO	COMPOSIÇÃO	MARCA
Solução Salina	8,5 g de NaCl (0,85%)	Labsynth®
	1,11 g de CaCl ₂ (10mM)	Reagen®
	1000 ml H ₂ O destilada	-

❖ **Ensaio de viabilidade por exclusão do azul de Tripan**

SOLUÇÃO	COMPOSIÇÃO	MARCA
Tripan	10 mg de azul de tripan	Sigma®
	100 mL de PBS	-

❖ Ensaio do BrdU

SOLUÇÃO	COMPOSIÇÃO	MARCA
5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU) 10mM	-	Sigma®
Anticorpo anti-BrdU	1 µL de anticorpo anti-BrdU	Sigma®
	500 µL de BSA (5%)	Dako®
Anticorpo biotinizado anti-imunoglobulina de camundongo	1 µL de anticorpo biotinizado anti-imunoglobulina de camundongo	Sigma®
	500 µL de BSA (5%)	Dako®
Diaminobenzidina (DAB)	5 µL de DAB	Immunotech®
	100 mL de Tris-HCl (0,05M) pH = 7,6	Proquímios®
	2 µL de DAB	Proquímios®
Estreptavidina-peroxidase	1 µL de estreptavidina-peroxidase	Sigma®
	100 µL de BSA (5%)	Dako®
Solução desnaturante	Formamida (70%)	Sigma®
	2xSSC (pH = 6,5 – 7,5)	-
SSC 10X	NaCl (1,5M)	Labsynth®
	Citrato de sódio (0,15M)	Labsynth®
	H ₂ O destilada	-
Tampão Tris (TBS) 10X	NaCl (1,5M)	Labsynth®
	Tris (0,5M) pH = 7,6	Proquímios®
	H ₂ O destilada	-

❖ Coloração diferencial por BE/LA

SOLUÇÃO	COMPOSIÇÃO	MARCA
Brometo de etídio	1 mg de brometo de etídio (100 µg/mL)	Sigma®
	10 ml de PBS	-
Laranja de acridina	1 g de laranja de acridina (100µg/mL)	Fluka®
	10 ml de H ₂ O destilada	-

❖ Citometria

SOLUÇÃO	COMPOSIÇÃO	MARCA
Iodeto de propídeo	1 mg de iodeto de propídeo	Boehringer®
	50 ml de PBS	-
Solução PI-ciclo	Iodeto de propídeo 50 mg/ml em PBS	-
	Citrato de sódio 0,2%	Labsynth®
	Triton X-100 0,1%	Isofar®
Solução de Rodamina 123	Rodamina 123 (1 mg/ml)	Sigma®
	Álcool etílico	Vetec®