



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA**

**FRACIONAMENTO BIOGUIADO DO EXTRATO BRUTO DA ESPONJA  
MARINHA *Monanchora arbuscula* (Duchassaing & Michelotti, 1864)  
COLETADA NO PARQUE ESTADUAL MARINHO PEDRA DA RISCA DO  
MEIO – CE.**

**ELTHON GOIS FERREIRA**

---

**TRABALHO SUPERVISIONADO (MONOGRAFIA)  
APRESENTADO AO DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA  
DE PESCA DO CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, COMO PARTE DAS  
EXIGÊNCIAS PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE  
ENGENHEIRO DE PESCA.**

---

**FORTALEZA - CEARÁ - BRASIL**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Prof<sup>a</sup>. Leticia Veras Costa Lotufo, PhD**  
**Orientadora/Presidente**

---

**Paula Christine Jimenez, M. Sc**  
**Co-orientadora**

---

**Prof. Manuel Antônio Andrade Furtado Neto, PhD**  
**Membro**

---

**Diego Veras Wilke, Biólogo**  
**Membro**

**VISTO:**

---

**Prof. Moisés Almeida de Oliveira, D.Sc**  
**Chefe do Departamento de Engenharia de Pesca**

---

**Prof. Raimundo Nonato de Lima Conceição, D.Sc**  
**Coordenador do Curso de Engenharia de Pesca**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

F44f Ferreira, Elthon Gois.

Fracionamento bioguiado do extrato bruto da esponja marinha monanchora arbuscula (duchassaing & michelotti, 1864) coletada no parque estadual marinho pedra da risca do meio — Ce / Elthon Gois Ferreira. – 2007.

80 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2007.

Orientação: Profa. Dra. Letícia Veras Costa Lotufo.

1. Esponjas marinhas - Brasil, Nordeste. 2. Esponja marinha Monanchora arbuscula . 3. Engenharia de Pesca. I. Título.

CDD 639.2

---

A Deus por ter me iluminado sempre ajudando a superar todos os obstáculos que estiveram no meio do caminho e ter me dado familiares e amigos maravilhosos

Meus pais, que sempre me apoiaram em todas as minhas decisões, me deram a educação que hoje tenho e que passarei as minhas futuras gerações.

A minha orientadora Dr<sup>a</sup>. Leticia Lotufo por ser uma pessoa admirável e que muito me ensinou durante a fase acadêmica.

## AGRADECIMENTOS

A DEUS por ter sempre me guiado a escolher os caminhos certos na minha vida me dando forças e coragem para enfrentar tudo que viesse a atrapalhar minha vida.

A Dr<sup>a</sup>. Letícia Veras Costa Lotufo pela oportunidade de exercer esse trabalho sob uma orientação excelente, pelo apoio incondicional, pela amizade, pela confiança, por todos os ensinamentos passados e por ter sempre me encorajado a realizar meus objetivos.

Ao Dr. Manoel Odorico de Moraes por ter permitido desenvolver este trabalho no Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) sob excelente estrutura proporcionada pelo mesmo.

A Dr<sup>a</sup>. Cláudia do Ó Pessoa por ter permitido a minha entrada no laboratório, por todo apoio dado para realização do trabalho e proporcionar melhores condições para que o trabalho fosse realizado.

A minha co-orientadora e mais que isso amiga Paula Christine Jimenez que sempre esteve pronta a me ajudar, por vários ensinamentos tanto acadêmicos quanto ensinamentos de vida, pelas noites bohemias cariocas regadas a muito samba e musicas de excelente qualidade e por todo apoio dado quando eu achava que era impossível (Elthon isso é para os fracos!).

Ao amigo Diego Veras Wilke pela parceria direta no trabalho, pela total dedicação, amizade, por todos os aprendizados e confiança.

Ao Dr. Edilberto R. Silveira por ter cedido o seu laboratório para realização da parte química deste trabalho.

A Dr<sup>a</sup>. Otilia Deusdênia Loiola Pessoa pela orientação e contribuição na a parte química deste trabalho.

A Dr<sup>a</sup>. Raquel Carvalho Montenegro pela sua imensa disposição em ajudar e ensinar sempre que preciso, pelas sugestões, amizade, convívio e apoio.

A Julieta Rangel de Oliveira por participar de forma decisiva na realização deste trabalho na parte química, pela grande amizade, pelo aprendizado, pelos excelentes conselhos e pelas historias engraçadas.

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

Ao Eduardo Esteves (Museu Nacional de Poríferos, UFRJ) pelas referencias bibliográficas cedidas, pela disposição, sempre que necessária, para tirar dúvidas.

Ao Dr. Tito Monteiro Lotufo por ter inicialmente me guiado para o LOE, pelas aulas de excelente qualidade que serão sempre lembradas e pela participação na coleta da espécie.

A Silvana França pela participação de forma admirável neste trabalho, pela paciência e pela amizade.

A Marne Vasconcellos por ter me guiado à Paula, pelo apoio dado nos momentos cruciais dessa monografia, pela amizade, pelo seu humor que hoje em dia me faz rir e pela convivência.

As amigas Carla Sombra (Carlotinha), Gardênia Militão, Ivana Dantas (Ivy) e Patrícia Marçal (Paty Paty) por esses anos de muita festa e muitas histórias para contar, pela parceria incontestável, carinho, amizade, confiança, pós de guaraná sempre juntos e ajuda em todos os momentos.

Aos amigos Ailton Teles (Babysauro), Andrew Sá, Bruno Cavalcanti, Daniel Bezerra, Danilo Rocha (Zé Piqueno) e Paulo Michel (Homem Limão) que são os homens companheiros de farras sobre as quais temos muitas histórias para contar, pós de guaraná, apoio, ajuda sempre que necessária e pelos “toques” dados.

Aos amigos do LOE Hemerson Yuri, José Roberto (Alagoano), Hélio Vitoriano, Cecília Carvalho, Fernanda Oliveira, Sabrina Ramos, Lidiane Arruda, Alessandra de Paula, Márcia Rocha, Kézia Lacerda, Felipe Rocha, Ana Jérсия, Delano Marinho, Arinice, Washigton Barros, Kristiana Mousinho e Marcio Roberto por todos esses anos de convivência, amizade, momentos de descontração no laboratório, cumplicidade e aprendizado.

A Luciana França por sempre estar à disposição, pelos lanches e pela montagem das lâminas.

Ao Paulo, Adriano e Maria de Fátima por sempre estarem trabalhando para manutenção dos materiais de trabalho e pela pronta ajuda quando necessária.

A todos os funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia e UNIFAC da UFC por sempre estarem trabalhando para dar condições para trabalhar.

Aos meus eternos amigos Francisco Jackson, Jackson Câmara e Phillipso Fernandes pelo companheirismo, cumplicidade, apoio, conselhos, aprendizados e acima de tudo por todas as histórias vividas cheias de “comédias”.

Aos professores Alexandre Sampaio, Silvana Saker, Moisés Oliveira e Wladimir Freitas por todo o conhecimento transmitido, pelas excelentes aulas ministradas, pela imensa vontade de dar aula, ajuda e prestatividade,

Aos grandes amigos de graduação Tereza Emanuelle, José Fábio, Wander Godinho e Karoline Aguiar por toda a paciência, carinho, confiança, incentivo, companheirismo e por todos esses anos de convivência.

Aos amigos de graduação Aline Mendes, Bruno Átila (Urêas de nós todos), Carol Pontes, Darlyanne Gadelha (Darly), Douglas Pinheiro, Francisca Andréa, Giuseppe, Jonatas Bezerra (Stheban), José Fernandes (Magá), Leandro Fonseca (Fofó da Barra), Leiliana Bezerra (Leilote), Nathalie Dias, Pedro Kolb (Peu), Rafael Rômulo (Arame) e Thiago Vitor (Beatlejuice) por todos esses anos de amizade, companheirismo, “comedias” e por terem alegrado os dias em que não agüentávamos mais estar em aulas.

As minhas amigas Luisa Costa e Gicelle Guerreiro pela amizade, paciência para me aturar, por sempre estarem dispostas a me escutar, pelos conselhos e incentivo.

A todo o pessoal do laboratório de química orgânica em especial ao Duvilardo e ao Ricardo pela paciência, atenção, ajuda e convivência durante o tempo que passei na química.

Ao Wilson Pedrosa e Walmique por todo apoio dado a mim durante minha fase acadêmica, pelos conselhos e experiências passadas.

Aos meus vizinhos Santana Sales, Vanessa Girão, Marcel Sales, Michelle Sales por serem para mim como uma segunda família, por todos os conselhos, broncas, amizade acima de tudo, incentivo e apoio em todas as decisões tomadas.

A minha avó materna que sempre esteve presente na minha educação, e com quem aprendi muito com suas experiências.

Aos meus pais, mesmo que separados sempre estiveram me apoiando em todas as minhas escolhas e por terem me possibilitado estudar e assim conseguir realizar meus objetivos almejados desde criança.

Aos meus tios Regina Morais e Carlos Morais por tudo, carinho, compreensão e incentivo.

A Letícia Gois minha irmã que amo muito e minha primas Priscila Karla e Patrícia Karla por todo carinho, amor e afeto para com minha pessoa.

Aos demais familiares e amigos por sempre acreditarem em mim.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de Iniciação Científica.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS -----	viii
LISTA DE TABELAS -----	ix
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS -----	x
RESUMO -----	xii
ABSTRACT -----	xiii
1. INTRODUÇÃO -----	1
1.1. Estudo de Produtos Naturais Marinhos -----	1
1.2. Filo Porífera -----	6
1.3. Potencial farmacológico da família Crambeidae e do gênero <i>Monanchora</i> -----	8
1.4. Relevância e Justificativa -----	10
2. MATERIAL E MÉTODOS -----	12
2.1. Materiais -----	12
2.1.1. Equipamentos -----	12
2.1.2. Soluções -----	13
2.1.3. Reagentes -----	13
2.1.4. Fármacos -----	14
2.1.5. Animais/ Modelos biológicos experimentais -----	14
2.2. Metodologias -----	14
2.2.1. Coleta do material -----	14
2.2.2. Identificação da espécie -----	15
2.2.3. Preparo do extrato bruto e fracionamento químico --	16
2.2.4. Triagem das frações bioativas -----	20
2.2.4.1 Estudos em células tumorais <i>in vitro</i> -----	20
2.2.4.1.1. Manutenção da cultura de células -----	20
2.2.4.1.2. Avaliação da citotoxicidade - Ensaio do MTT -----	21
2.2.4.1.3. Análise dos resultados -----	22
2.2.4.2. Avaliação do dano à membrana plasmática - Teste Hemolítico -----	22
2.2.4.2.1. Análise dos resultados-----	23
3. RESULTADOS -----	24
3.1. Fracionamento bioquímico do extrato bruto e isolamento de compostos da espécie <i>Monanchora arbuscula</i> -----	24
3.2. Avaliação do potencial citotóxico -----	25
3.3. Avaliação quanto ao dano em membrana plasmática -----	28
3.4. Análise dos resultados obtidos -----	30
4. DISCUSSÃO -----	31
5. CONCLUSÃO -----	40
6. BIBLIOGRAFIA -----	41



## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b>	Estruturas químicas da (a) Espongouridina, (b) Espongotimidina, (c) Vidarabina e (d) Citarabina-----	3
<b>Figura 2</b>	Estruturas químicas de ecteinascidina 743, dolastatina 10, briostatina 1 e criptoficina 52-----	4
<b>Figura 3</b>	Desenho esquemático de uma esponja (do tipo asconóide), evidenciando sua estrutura e alguns tipos celulares. Fonte: <a href="http://fossil.uc.pt/imags/esponja_esquema.jpg">http://fossil.uc.pt/imags/esponja_esquema.jpg</a> -----	7
<b>Figura 4</b>	Mapa do Parque Estadual Pedra da Risca do Meio – CE (modificado por Diego V. Wilke). Fonte: <a href="http://www.projetonetuno.com.br/images/mapa_gran.gif">http://www.projetonetuno.com.br/images/mapa_gran.gif</a> -----	15
<b>Figura 5</b>	Fotografia da espécie <i>Monanchora arbuscula</i> , registrada no Parque Estadual Pedra da Risca do Meio, Ceará, em julho de 2004. Por Eduardo Hajdu-----	15
<b>Figura 6</b>	Representação esquemática da obtenção do extrato bruto e respectivas partições líquido/líquido da <i>Monanchora arbuscula</i> . As amostras dos balões preenchidos de azul foram submetidas ao teste do MTT para verificação de atividade biológica-----	17
<b>Figura 7</b>	Esquema mostrando a obtenção das misturas e compostos puros das frações MADCM e MAAC-----	20
<b>Figura 8</b>	Estruturas dos compostos: ptilocaulina, 8b-β-hidroxiptilocaulina, Mirabilina B, 1,8a;8b,3a-dideidro-8β-hidroxiptilocaulina e 1,8a;8b,3a-dideidro-8α-hidroxiptilocaulina-----	25
<b>Figura 9</b>	Gráfico representativo da curva de concentrações determinadas pelos ensaios do MTT e hemólise dos compostos PT e 8HPT-----	29

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1</b>	Compostos derivados de fontes marinhas em fase de testes para o tratamento do câncer-----	5
<b>Tabela 2</b>	Atividade antiprolifertiva do extrato bruto e das frações obtidas determinadas pelo método do MTT após 72hs de incubação. Os valores representam suas $CI_{50}$ e $IC_{95\%}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) -----	26
<b>Tabela 3</b>	Frações ativas, misturas e compostos puros obtidos do extrato bruto de <i>M. arbuscula</i> testadas em linhagens celulares tumorais pelo método do MTT após 72hs de incubação. Os valores abaixo se referem as $CI_{50}$ e $IC_{95\%}$ dados em $\mu\text{g/mL}$ para frações-----	27
<b>Tabela 4</b>	Valores de $CE_{50}$ e $IC_{95\%}$ referentes ao teste de hemólise em eritrócitos murinos após 1h de incubação das frações e compostos puros isolados ( $\mu\text{g/mL}$ ) ativos no ensaio do MTT-----	28
<b>Tabela 5</b>	Valores de $CI_{50}$ e $CE_{50}$ dos ensaios de MTT e hemólise respectivamente, relacionando quanto à razão de atividade entre <b>PT</b> e <b>8HPT</b> expressos em $\mu\text{g/mL}$ -----	30

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

%	Porcentagem
&	E
μL	Microlitro
[ ]	Concentração
<	Menor que
>	Maior que
AcOEt	Acetato de etila
CC	Coluna Cromatográfica
CCDC	Cromatografia de camada delgada comparativa
CE <sub>50</sub>	Concentração efetiva média
CI <sub>50</sub>	Concentração inibitória média
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono (gás carbônico)
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
E.P	Éter de Petróleo
EHA	Extrato hidroalcoólico bruto
EtOH	Álcool etílico
g	Gramma
h	Hora
H <sub>2</sub> O	Água destilada
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IC	Intervalo de confiança
Km	Quilômetro
Km <sup>2</sup>	Quilômetro quadrado
L	Litro
M	Molar
m/v	Massa/Volume
MDR	Multi-drug resistance (Resistência a múltiplas drogas)
MeOH	Álcool metílico
mg	Miligrama
MHz	Megahertz
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazolina bromida
nm	Nanômetro
n <sup>o</sup>	Número

°C	Graus Celcius
PBS	Phosphate buffer solution (Tampão fosfato)
PEMPRM	Parque Estadual Marinho Pedra da Risca do Meio
pH	Potencial hidrogeniônico
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RNM <sup>1</sup> H	Ressonância Nuclear Magnética de Prótons
rpm	Rotações por minuto
SE	Solução de Eritrócitos
US-NCI	United States National Cancer Institute (Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos)
X	Vezes
µg	Micrograma

**Fracionamento bioguiado do extrato bruto da esponja marinha *Monanchora arbuscula* (Duchassaing & Michelotti, 1864) coletada no Parque Estadual Marinho Pedra da Risca do Meio – CE. Autor:** Elthon Gois Ferreira. **Orientadora:** Dra. Letícia Veras Costa Lotufo. **Co-orientadora:** M.Sc. Paula Christine Jimenez. Monografia de Graduação. Departamento de Engenharia de Pesca. Universidade Federal do Ceará. Dezembro, 2007.

## RESUMO

As esponjas marinhas vêm se destacando como uma rica fonte de produtos naturais com interessantes atividades biológicas, principalmente a citotoxicidade. O presente trabalho teve como objetivo realizar o fracionamento químico do extrato bruto da esponja marinha *Monanchora arbuscula* coletada no Parque Estadual Marinho Pedra da Risca do Meio – CE guiado pela atividade citotóxica. O material coletado foi homogeneizado e concentrado em um extrato bruto que foi particionado com solventes de diferentes polaridades e as frações derivadas foram particionadas em colunas cromatográficas. Das frações mais ativas - diclorometano e acetato de etila - foram obtidos os compostos ptilocaulina (PT), 8b- $\beta$ -hidroxiptilocaulina (8HPT), mirabilina B, uma mistura de epímeros composta por 1,8a;8b,3a-dideidro-8 $\beta$ -hidroxiptilocaulina e 1,8a;8b,3a-dideidro-8 $\alpha$ -hidroxiptilocaulina e uma mistura de alcalóides ainda não identificados. A avaliação da citotoxicidade utilizou-se do método colorimétrico do MTT em 4 linhagens de células tumorais: HL-60 (leucemia), HCT- 8 (cólon), MDA-MB-435 (melanoma) e SF-295 (glioblastoma), após 72hs de incubação. As amostras ativas foram avaliadas quanto ao seu potencial em causar danos à membrana plasmática em eritrócitos de camundongos *Mus musculus*. Os compostos PT e 8HPT apresentaram uma atividade citotóxica contra as linhagens de células tumorais, mostrando, inclusive, uma relativa especificidade para as linhagens de melanoma (MDA-MB-435) e leucemia (HL-60), sendo o composto PT em média 1,8X mais ativo que o composto 8HPT. Esses compostos também apresentaram atividade hemolítica, porém em concentrações bem superiores as encontradas para suas concentrações efetivas médias (CI<sub>50</sub>).

**Bioguided fractionation of the crude extract derived from the marine sponge *Monanchora arbuscula* (Duchassaing & Michelotti, 1864) collected at Pedra da Risca do Meio Marine State Park – CE. Author:** Elthon Gois Ferreira. **Advisor:** Dra. Leticia Veras Costa Lotufo. **Co-advisor:** M.Sc. Paula Christine Jimenez. Graduation Honor Thesis. Departamento de Engenharia de Pesca. Universidade Federal do Ceará. December, 2007.

## ABSTRACT

Marine sponges have gained great importance as a promising source of natural products with interesting biological activities, including cytotoxicity. This work aimed at the chemical fractionation of the extract derived from the marine sponge *Monanchora arbuscula* collected at the Pedra da Risca do Meio Marine State Park – CE bio-guided by cytotoxic activity. The collected material was homogenized and concentrated as a crude extract. The extract was partitioned with different solvents and fractionated in chromatographic columns. The compounds Ptilocaulin (PT), 8b-Hydroxyptilocaulin (8HPT), Mirabilin B and the epimeres mixture of 1,8a;8b,3a-didehydro-8 $\beta$ -hydroxyptilocaulin and 1,8a;8b,3a-didehydro-8 $\alpha$ -hydroxyptilocaulin were obtained from the active fractions, dichloromethane and ethyl acetate. A mixture of yet unidentified alkaloids, was also obtained. For cytotoxicity evaluation, the MTT colorimetric method was used, as well as four different tumor cell lines - HL-60 (leukemia), HCT- 8 (colon), MDA-MB-435 (melanoma) and SF-295 (glioblastoma) – during a 72h incubation period. The active samples were evaluated for lytic effects on *Mus musculus* mouse erythrocytes. PT and 8HPT showed a cytotoxic activity towards all tumor cell lines tested, exhibiting a relative specificity to the melanoma and leukemia cell lines, with an average of 1.8-fold greater potency of PT compared to 8HPT. These compounds also showed hemolytic activity, but in concentrations much higher than those obtained for mean antiproliferative activity on the tumor cell lines.

**Key-words:** cytotoxicity, ptilocaulin, 8b-hydroxyptilocaulin, Pedra da Risca do Meio Marine State Park, sponges.

FRACIONAMENTO BIOGUIADO DO EXTRATO BRUTO DA ESPONJA  
MARINHA *Monanchora arbuscula* (Duchassaing & Michelotti, 1864)  
COLETADA NO PARQUE ESTADUAL MARINHO PEDRA DA RISCA DO  
MEIO – CE.

ELTHON GOIS FERREIRA

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Estudo de Produtos Naturais Marinhos:

Mais da metade dos compostos isolados e utilizados na terapêutica de doenças são moléculas provenientes de produtos naturais (Mann, 2002). Mesmo sendo recente, o estudo dos produtos naturais de origem marinha têm se mostrado muito promissor por ter apresentado uma gama imensa de estruturas únicas, oriundas principalmente de invertebrados voltando grande interesse para a pesquisa na área de farmacologia (Proksch *et al.*, 2002).

Os organismos que habitam os oceanos estão sujeitos a muitas pressões impostas por esse ambiente, selecionando assim, aquelas espécies que apresentem mecanismos de defesa contra a predação, favorecendo a competição por espaço e auxiliando na captura de presas. A defesa química é uma das soluções encontradas, freqüentemente, em animais de hábito sésil, corpo mole e sem defesa mecânica. Dentre os principais grupos estudados, estão as esponjas, briozoários, ascídias, moluscos e cnidários (Burkhard, 2003; Donia & Hamann, 2003). O estudo dos compostos obtidos desses

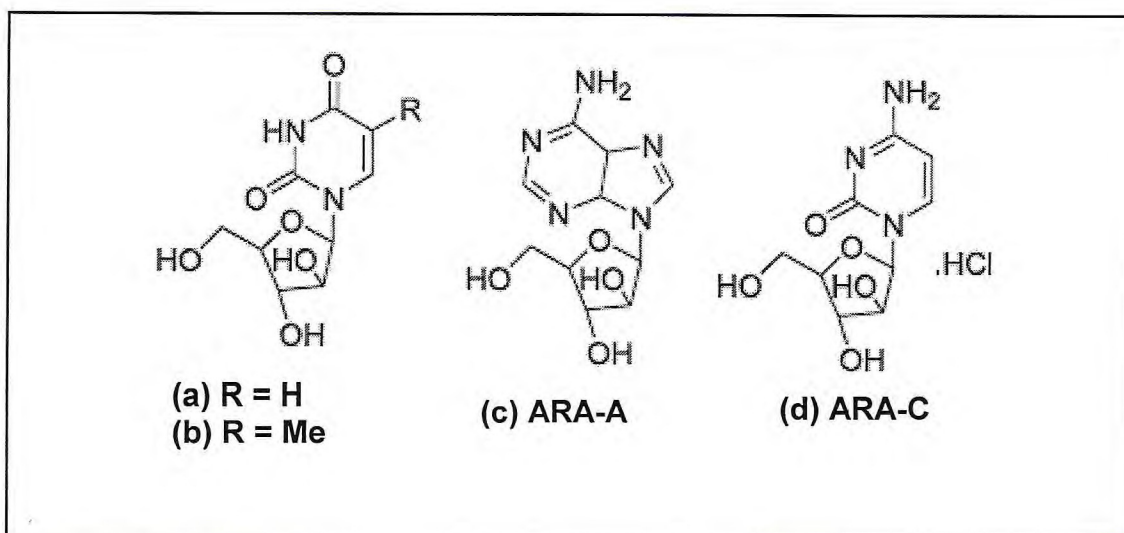
organismos vem se mostrando muito promissor para a área biomédica (Nagle *et al.*, 2004).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), 80% da população mundial utiliza-se diretamente dos recursos naturais no tratamento de doenças (Farnsworth *et al.*, 1985; Cragg & Newman, 1999) e os 20 % restantes fazem uso de medicamentos derivados destes produtos, sendo que mais da metade dos fármacos em uso clínico devem sua origem a fontes naturais (Balandrin *et al.*, 1993; Cragg & Newman, 1999).

O câncer continua sendo a segunda causa de morte por doença no mundo e também no Brasil (INCA, 2006). Mesmo com uma grande quantidade de fármacos existente para o tratamento de neoplasias malignas e sucesso em diversos tumores, ainda não se chegou a um composto ideal. Por isso, a busca por novos compostos mais potentes, seletivos, que apresentem menos efeitos colaterais e menor índice de resistência se faz tão importante.

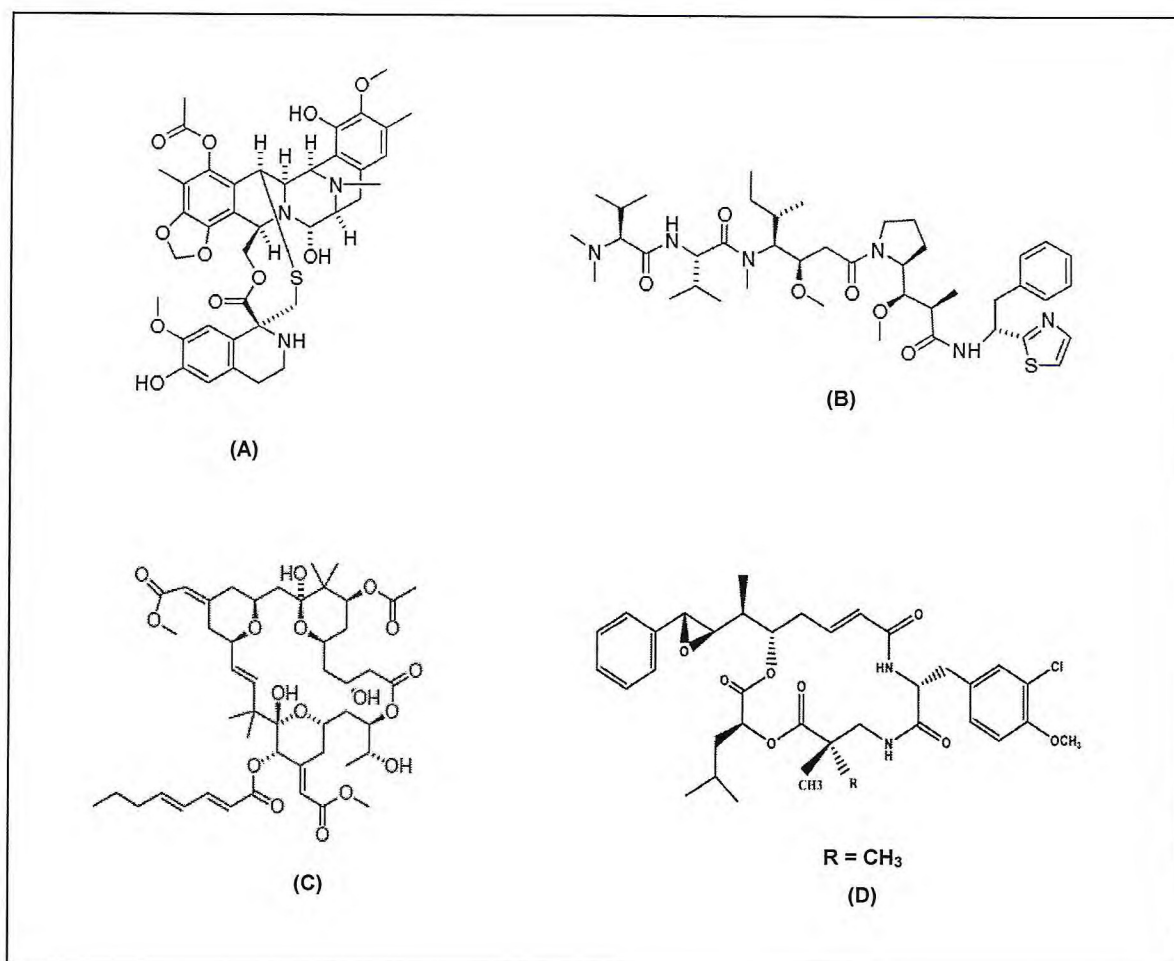
O trabalho de Bergman e Feeney na década de 50 com a esponja caribenha *Cryptotethya crypta* foi o marco do início do estudo com produtos naturais marinhos devido ao isolamento de dois nucleosídeos, a espongouridina e espongotimidina (figura 1) que serviram de protótipo para o desenvolvimento de uma nova classe de análogos - Ara-A (Vidarabina, Vidarabin Thilo<sup>®</sup>) e Ara-C (Citarabina, Alexan<sup>®</sup>, Udicil<sup>®</sup>) (Sipkema *et al.*, 2005). Atualmente, o Ara-A e o Ara-C (figura 1) são os únicos derivados de produtos naturais marinhos utilizados em tratamentos clínicos de viroses e tumores respectivamente (Proksch *et al.*, 2002).





**Figura 1** – Estruturas químicas da (a) Espongouridina, (b) Espongotimidina, (c) Vidarabina e (d) Citarabina.

Atualmente, outras substâncias encontram-se em estudos clínicos em fases bem avançadas como, a tetrahydroisoquilona ecteinascidinas 743, agente antitumoral isolado da ascídia *Ecteinascidia turbinata* (ET-743) que se encontra em fases I, II e III, enquanto a briostatina 1 isolada do briozoário *Bugula neritina* está em fases I e II de estudos, já as criptoficina 52 um depsipeptídeo isolado da cianobacteria *Nostoc sp.*, e a dolastatina 10 composto isolado do molusco *Dolabella auricularia* encontram-se em fase II (Tabela 1). (Bhargava *et al.*, 2001 ; Delaloge *et al.*, 2001; Mayer & Gustafson, 2006 ; Newman & Cragg, 2004; Shin, & Teicher, 2001; Varterasian *et al.*, 2001; Vaishampayan *et al.*, 2000 ).



**Figura 2** – Estruturas químicas de ecteinascidina 743 (A), dolastatina 10 (B), briostatina 1 (C) e criptoficina 52 (D).

**Tabela 1** - Compostos derivados de fontes marinhas em fase de testes para o tratamento do câncer

Composto	Espécie	Mecanismo de Ação	Status do estudo
Citarabina	<i>Cryptotethya crypta</i>	Inibição da síntese de DNA	Fase III/IV
Briostatina 1	<i>Bugula neritina</i>	Ativação de PKC	Fase I e II
ET-743	<i>Ecteinascidia turbinata</i>	Alquilação de DNA	Fase I / II e III
Didemnina B	<i>Trididemnum solidum</i>	Inibição da síntese protéica Apoptose	Fase II (retirada)
Aplidina	<i>Aplidium albicans</i>	Bloqueio do ciclo celular em G1	Fase II
Dolastatina 10	<i>Dolabella auricularia</i>	Inibição de microtúbulos Apoptose	Fase II
Criptoficina 52	<i>Nostoc</i> sp.	Hiperfosforilação de Bcl-2	Fase II
Halicondrina B	<i>Halichondria okadai</i> <i>Lissodendoryx</i> sp.	Interação com tubulina	Fase I e II
Discodermolida	<i>Discodermia dissoluta</i>	Estabilização da tubulina	Pré-clínica
Ácido ocadaico	<i>Prorocentrum lima</i>	Interação com fosfatases protéicas	Pré-clínica
Aplironina A	<i>Aplysia kurodai</i>	Inibição de polimerização da actina	Pré-clínica
Dercitina	<i>Dercitus</i> sp.	Intercalação no DNA	Pré-clínica
Macaluvaminas	<i>Zyzzya</i> sp.	Inibição da topoisomerase II	Pré-clínica
Naamidina A	<i>Leucetta chgorensis</i>	Inibição de EGF	Pré-clínica
Agosterol A	<i>Spongia</i> sp.	Reversão de MDR	Pré-clínica
Isogranulatimida	<i>Didemnum granulatum</i>	Bloqueio do ciclo celular em G2	Pré-clínica

**Fonte:** Schwartzmann *et al.*, 2001; Newman & Cragg, 2004; Jimenez, 2004 ; Delalogue *et al.*, 2001; Bhargava *et al.*, 2001; Varterasian *et al.*, 2001; Vaishampayan *et al.*, 2000; Shin, & Teicher, 2001; Mayer & Gustafson, 2006.

## 1.2. Filo Porífera:

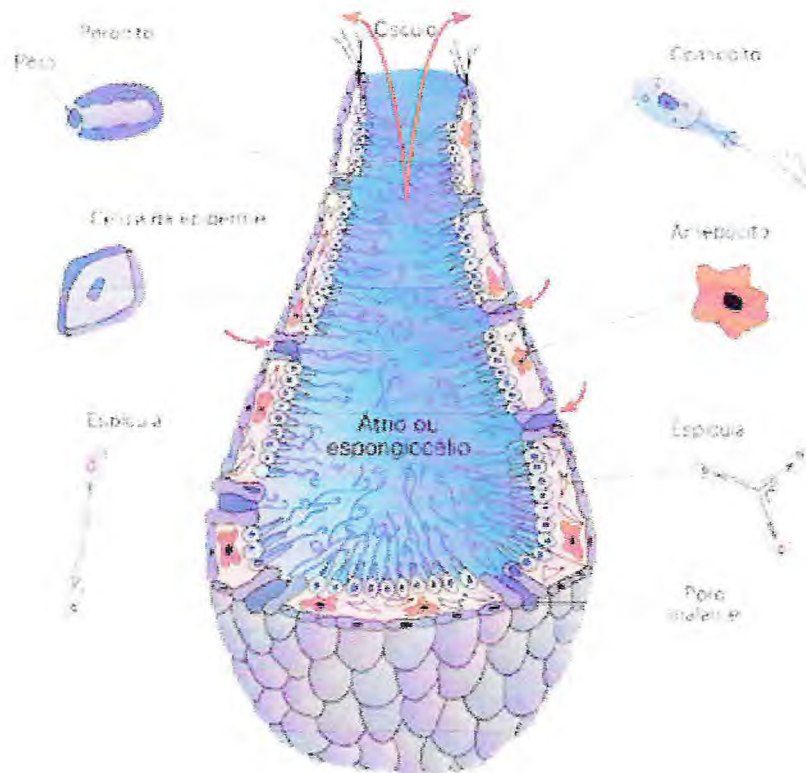
As esponjas são animais multicelulares com organização simples que constituem o filo Porífera. Estima-se que existam em torno de 5000 espécies de esponjas, que em sua grande maioria habitam o ambiente marinho podendo também ser encontradas tanto em águas doce quanto em águas salobras, são animais de hábito sésil com as mais variadas formas, dimensões e cores. Taxonomicamente o filo Porífera é dividido pela sistemática em três classes distintas: Calcarea, Hexactinellida e Demospongiae (Hickman, Roberts e Larson, 2003).

Revestindo a parte externa do corpo das esponjas há um grande número de poros denominados de óstios, de onde se originou o nome Porífera (portador de poros), e canais que servem de sistema de alimentação e filtração do animal, adequado para o hábito de vida sésil, sendo classificados em três tipos diferentes de acordo com a complexidade do seu sistema aquífero, do mais simples ao mais complexo tem-se: asconóides, siconóides e leuconóides (Hickman, Roberts e Larson, 2003; Ruppert & Barnes, 1996).

Apesar serem multicelulares estes animais não apresentam tecido verdadeiro, desta forma as células que envolvem seu corpo realizam diversas funções, apresentando um alto grau de independência (Ruppert & Barnes, 1996).

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. Os porócitos são células em formato de anel que ligam à superfície externa do animal a cavidade interna denominada de espongiocele (átrio). Abaixo da pinacoderme encontra-

se o mesoílo constituído de uma matriz proteinácea gelatinosa, é equivalente ao tecido conjuntivo de metazoários, e possui material esquelético e células amebóides denominadas de arqueócitos (figura 2) (Hickman, Roberts e Larson, 2003; Ruppert & Barnes, 1996).



**Figura 3** – Desenho esquemático de uma esponja (do tipo asconóide), evidenciando sua estrutura e alguns tipos celulares. **Fonte:** [http://fossil.uc.pt/imags/esponja\\_esquema.jpg](http://fossil.uc.pt/imags/esponja_esquema.jpg).

### 1.3. Potencial farmacológico da família Crambeidae e do gênero *Monanchora*:

As esponjas pertencentes à família Crambeidae pertencem à ordem Poecilosclerida, são incrustantes com formato ramoso irregular ou tubulares podendo ser encontradas em rochas, corais e mangues, principalmente em águas rasas, mas alguns gêneros podem ocorrer em profundidades de até 180m (Van Soest, R.W.M., 2002). Alcalóides guanidínicos cíclicos são encontrados, freqüentemente, nas espécies pertencentes a essa família, tendo sido inclusive sugerido que estes compostos possam ser usados como marcadores taxonômicos para os seus gêneros (Tavares *et al.*, 1994).

A classe de alcalóides guanidínicos policíclicos isolados, predominantemente, de esponjas pertencentes às ordens Poecilosclerida e Axinellida é conhecida por exibirem uma ampla variedade de atividades biológicas dentre elas citotóxica, antiviral e antibacteriana (Hua *et al.*, 2004). Os gêneros *Crambe*, *Monanchora* e *Batzella* pertencentes a essa ordem e o gênero *Ptilocaulis* pertencente à ordem Axinellida geralmente apresentam estes tipos de compostos (Chang *et al.*, 2003).

O isolamento da ptilomicalina A da espécie *Ptilocaulis spiculifer* foi o marco inicial para o estudo destes compostos. Esta molécula foi, posteriormente, isolada da espécie *Hemimycale sp.* observando-se, nesse estudo, que este é um composto com atividade citotóxica potente em linhagens de células tumorais apresentando também atividade anti-fúngica contra *Candida albicans* e antiviral contra *Herpes simplex* tipo 1 (HSV-1), desde então vários outros compostos foram isolados de esponjas marinhas dos gêneros acima citados (Heys *et al.*, 1999).

As crambescidinas foram isoladas, inicialmente, da esponja marinha *Crambe crambe* e, posteriormente, das esponjas brasileiras *Monanchora unguiculata* e *Monanchora arbuscula* (Patil, A.D., 1997). Estes são compostos com atividade citotóxica em diversas linhagens de células, são ichtiotoxicos (tóxicos em peixes), potente atividade antiviral contra Herpes simplex e, especificamente, a crambescidina 816 é uma potente bloqueadora de canais de cálcio (Heys , 2000).

As batzelladinas são alcalóides guanidínicos tricíclicos que, semelhantemente às ptilomocalinas, possuem um grande potencial antiHIV-1, anticâncer e antiprotozoária (Hua *et al.*, 2004 ). Estes compostos foram relatados de espécies do gênero *Batzella*, sendo também presentes no gênero *Monanchora*, de acordo com trabalhos encontrados na literatura. No gênero *Batzella* também é possível encontrar crambescidinas, mirabilinas e ptilocaulinas (Patil *et al.*, 1995).

O gênero *Monanchora*, semelhantemente a todos os gêneros pertencentes à família Crambeidae, é rico em alcalóides guanidínicos. Muricy e colaboradores (1993) realizaram um estudo do potencial antifúngico e antimicrobiano do extrato bruto de 21 espécies de esponjas encontradas no sudoeste do atlântico e observaram que o extrato etanólico da espécie *M. arbuscula* apresentou um potencial promissor quanto à atividade antiinfeciosa.

Em um estudo realizado por Hui-ming Hua e colaboradores (2004) foram isolados 3 alcalóides guanidínicos da espécie *Monanchora unguifera*, a saber, Mirabilina B, 1,8a;8b,3a-dideidro-8β-hidroxiptilocaulina e um isômero

inédito deste a 1,8a;8b,3a-dideidro-8α-hidroxiptilocaulina. Nenhum dos compostos exibiu atividade citotóxica relevante contra linhagens de células tumorais, porém a Mirabilina B apresentou atividade anti-fúngica contra *Cryptococcus neoformans* e anti-protozoária contra *Leishmania donovani* e a mistura de isômeros foi ativa contra *Plasmodium falciparum*.

#### **1.4. Relevância e Justificativa:**

Sabendo-se que 70% da superfície do planeta correspondem a ecossistemas marinhos, os quais representam 95% da biosfera, o estudo desses ambientes tem se tornado cada vez mais promissor por apresentarem uma imensa biodiversidade. No tocante a alternativas terapêuticas, tem se mostrado farmacológicas que auxiliem no tratamento de inúmeras patologias, dentre elas o câncer (Burkhard Haefner, 2003).

O Brasil apresenta uma costa com aproximadamente 8.500 km de extensão, sendo que a maior porção tropical dela encontra-se na região nordeste. Contudo, pouco se conhece sobre os organismos que habitam esse ambiente. A pesquisa voltada para prospecção de compostos com potencial farmacológico desses organismos é considerada estratégica por envolver o estudo da biodiversidade, pouco conhecida e ainda praticamente inexplorada, das espécies que habitam essas águas.

O potencial farmacológico dos invertebrados marinhos da costa cearense foi pouco explorado pelos grupos de pesquisa até o momento, mas alguns trabalhos merecem destaque. Em 2003, Jimenez e colaboradores realizaram um *screening* (triagem) do extrato das 10 espécies de ascídias mais abundantes do litoral cearense, avaliando quanto ao potencial citotóxico, 6 das



10 espécies estudadas mostraram-se promissoras fontes de compostos com atividade citotóxica.

Outros dois trabalhos estudaram o potencial citotóxico de esponjas marinhas. O primeiro consistiu em um *screening* com extratos hidroalcoólicos das 8 esponjas mais abundantes encontradas na zona intertidal na praia de Flexeiras (Trairi), onde avaliou-se o potencial citotóxico e antimicrobiano dos mesmos. Dentre as 8 espécies estudadas, 7 apresentaram atividade em algum dos ensaios realizados (Jimenez *et al.*, 2004). Em 2007, Ferreira e colaboradores publicaram um *screening* para atividade citotóxica e antimitótica de extratos hidroalcoólicos de 22 espécies de esponjas coletadas no Parque Estadual Marinho Pedra da Risca do Meio, Ceará (PEMPRM) no qual foram encontradas 9 espécies citotóxicas e 19 que inibiram a divisão de ovos de ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* (Ferreira *et al.*, 2007).

Dentre as espécies mais promissoras deste trabalho (Ferreira *et al.*, 2007), a espécie *M. arbuscula* foi selecionada por se destacar das demais exibindo potente citotoxicidade em 4 linhagens de células tumorais apresentando concentrações inibitórias médias (CI<sub>50</sub>) do extrato hidroalcoólico bruto variando de 1,601 a 2,032 µg/mL. Também observou-se 100% de inibição dos ovo de ouriço-do-mar em concentração única de 500 µg/mL (Ferreira *et al.*, 2007).

O objetivo do presente trabalho foi realizar o fracionamento químico e purificação do extrato bruto da esponja marinha *Monanchora arbuscula* coletada no Parque Estadual Marinho Pedra da Risca do Meio – CE guiado pela atividade citotóxica, bem como estudar a citotoxicidade das substâncias isoladas em células tumorais *in vitro*.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Materiais**

#### **2.1.1. Equipamentos**

Agitador de placa MLW Modelo Thys 2

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

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 e Injetor Manual Rheodyne Modelo 7125

Espectrofotômetro de placas Packard Spectra Count

Evaporador rotativo Fisatom Modelo 802

Fluxo laminar VECO

Frascos para cultura de células Corning

Incubadora de células (CO<sub>2</sub> Water-Jacket Incubator) NUAIRE TS Autoflow

Liofilizador E – C Micromodulye com Bomba Valupump Savant Modelo VLP 80

Microscópio óptico Metrimpex Hungary/PZO-Labimex Modelo Studar lab

Microscópio óptico de inversão Nikon Diaphot

RMN Bruker DPX-300

### 2.1.2. Soluções

<b>Meio de cultura de células RPMI 1640</b>	Diluído em água deionizada e esterelizada, filtrado em filtro millipore – 0,22 mm – e complementado com 10% SBF, 1% de glutamina, 1% de antibióticos, 1% de bicarbonato de sódio (0,75%) e 25 mM de HEPES	Cultilab
<b>MTT</b>	20 mg de MTT PBS q.s.p. 100 mL de solução	Sigma
<b>Penicilina - estreptomicina</b>	Penicilina 10.000 U.I./mL Estreptomicina 10 mg/mL	Cultilab Cultilab
<b>Solução salina (para hemólise)</b>	8,5 g de Cloreto de sódio (0,85%) 1,11 g de Cloreto de cálcio (10 mM) H <sub>2</sub> O q.s.p 1 L de solução	Labsynth Reagen
<b>Soro fetal bovino</b>	-	Cultilab
<b>Tampão fosfato (PBS)</b>	8,766 g de Cloreto de sódio 2,14 g de NaHPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,276 g de NaHPO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	Labsynth Labsynth Labsynth
<b>Tripsina 0,25%</b>	H <sub>2</sub> O q.s.p. 1 L de solução (pH = 7,2) 50 mL de Tripsina 2,5% 0,125 g de EDTA 450 mL de PBS	- Cultilab Proquímios
<b>Triton X -100 1%</b>	1 mL de Triton X-100 H <sub>2</sub> O q.s.p. 100 mL de solução	Isofar

### 2.1.3. Reagentes

Acetato de Etila Vetec	Álcool Etilico Vetec
Ácido Acético Vetec	Éter de Petróleo Vetec
Ácido Clorídrico Vetec	Álcool Metílico Vetec
Ácido Sulfúrico Vetec	Sephadex LH-20 Pharmacia
Diclorometano Vetec	Sílica gel 60 GF <sub>254</sub> Merck
DMSO Vetec	

#### **2.1.4. Fármaco**

Doxorrubicina Zodiac (fornecida pela farmácia do Instituto do Câncer do Ceará – ICC)

#### **2.1.5. Animais/Modelos Biológicos Experimentais**

Camundongos *Mus musculus* Swiss

Linhagens celulares tumorais:

### **2.2. Metodologias**

#### **2.2.1. Coleta do material:**

A espécie *Monanchora arbuscula* (figura 5) foi coletada no Parque Estadual Marinho Pedra da Risca do Meio, Ceará (figura 4), distante 10 milhas náuticas (aproximadamente 18,52 Km) do Porto do Mucuripe, em Fortaleza, na direção 60°. Com uma área de 33,20Km<sup>2</sup>, o parque marinho 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 por mergulho autônomo em profundidades que variam de 17 a 30m. Após a coleta foi feita a retirada dos contaminantes do material, pesagem e em seguida o mesmo foi imerso em etanol (1,5L) e estocado em freezer a -18 °C até o momento da preparação do extrato bruto.



**Figura 4** - Mapa do Parque Estadual Pedra da Risca do Meio – CE (modificado por Diego V. Wilke). Fonte: [http://www.projetonetuno.com.br/images/mapa\\_gran.gif](http://www.projetonetuno.com.br/images/mapa_gran.gif).

### 2.2.2. Identificação da espécie:

Uma amostra do material coletado foi separada e fixada em solução de etanol a 70% para identificação pelo Dr. Eduardo Hajdu do Museu Nacional de Poríferas, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

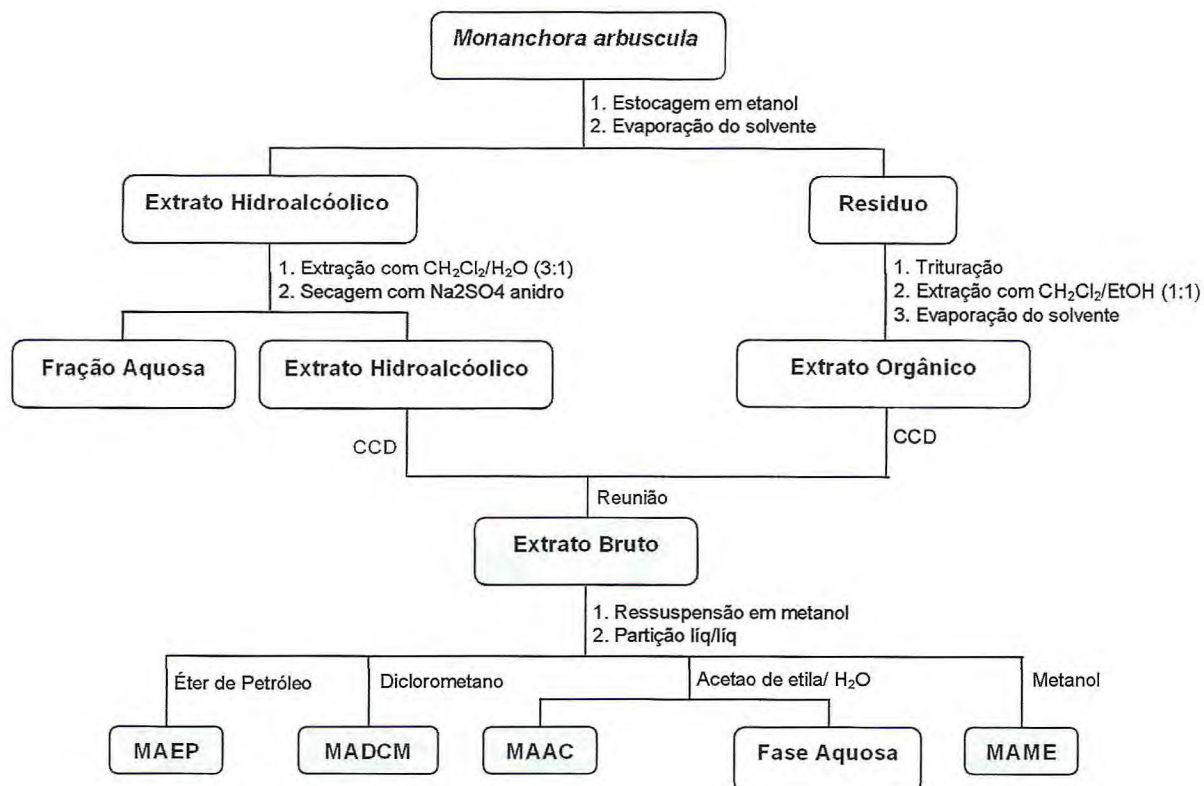


**Figura 5** - Fotografia da espécie *Monanchora arbuscula*, registrada no Parque Estadual Marinho Pedra da Risca do Meio, Ceará, em julho de 2004. Por Eduardo Hajdu.

### 2.2.3. Preparo do extrato bruto e fracionamento químico:

Esta etapa do trabalho foi realizada no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará com a participação da mestranda Julieta Rangel de Oliveira e sob a orientação do Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira e co-orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Otilia Deusdênia Loiola Pessoa.

O etanol utilizado para estocagem do material foi separado e evaporado em evaporador rotativo originando assim o extrato hidroalcoólico (9,14g), em seguida o mesmo foi extraído com diclorometano e água obtendo-se assim uma fração aquosa e um extrato hidroalcoólico. As colônias de *M. arbusucula* (1,5 Kg) foram homogeneizadas em 4,5 L de etanol/diclorometano 1:1 (v/v) e, em seguida, filtrado. O filtrado foi seco em evaporador rotativo numa temperatura máxima de 50°C, obtendo assim o extrato orgânico (8,75g). Tanto o extrato hidroalcoólico quanto o extrato orgânico foram submetidos à análise por cromatografia em camada delgada (CCD) e reunidos por similaridade, obtendo-se assim o extrato bruto (17,89g) como esquematizado na figura 6.



**Figura 6** - Representação esquemática da obtenção do extrato bruto e respectivas partições líquido/líquido da *Monanchora arbuscula*. As amostras dos balões preenchidos de azul foram submetidas ao teste do MTT para verificação de atividade biológica.

O extrato bruto seco foi dissolvido em metanol (200 mL) e submetido a uma partição líquido-líquido (figura 6), que foi acondicionado em um funil de separação e extraído com éter de petróleo (3 X 100 mL), originando 2 fases distintas. A fase menos polar foi separada originando assim a fração éter de petróleo (MAEP) (4,15g), enquanto que a fase mais polar foi novamente submetida a uma partição com diclorometano/água (2 X 100 mL) obtendo-se, assim, a fração diclorometano (MADCM) (7,34g) e o resíduo metanólico.

O resíduo metanólico foi novamente submetido a uma partição líquido-líquido em acetato de etila (2 X 100 mL) e água (30 mL), obtendo-se as frações acetato de etila (MAAC) (2,89mg), uma fase aquosa e a fração metanólica (MAME) (1,45g).

A fração MADCM, depois de seca, foi aliqüotada (1g, 2,51g e 2,22g) e cromatografada separadamente em coluna em gel de SEPHADEX LH-20, utilizando metanol como eluente (figura 7). As frações obtidas foram submetidas à análise comparativa em CCD e posteriormente reunidas por semelhança, obtendo-se assim as frações MADCM I (898,2 mg), MADCM II (1,94g) e MADCM III (164,7mg).

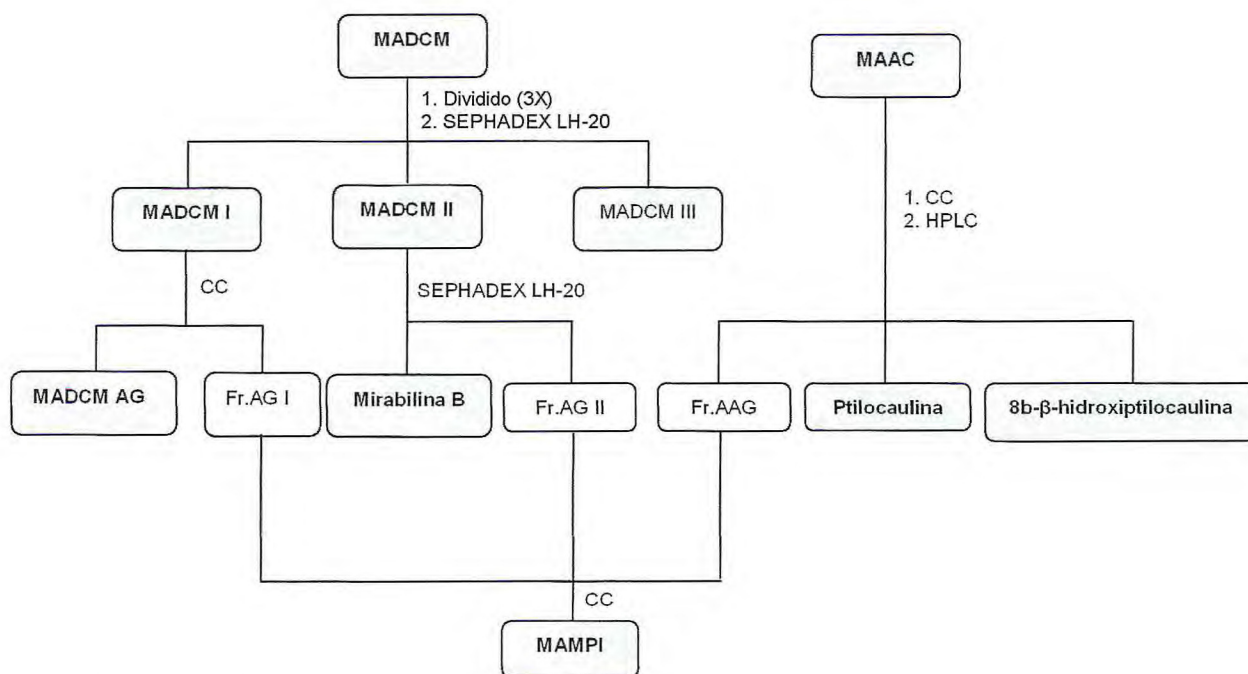
A fração MADCM I foi cromatografada em gel de sílica por coluna cromatográfica (CC). A eluição do material foi realizada com diclorometano, acetato de etila e metanol puros ou em misturas binárias em escala crescente de polaridade. As duas frações obtidas dessa coluna foram submetidas a uma RMN  $^1\text{H}$ , sendo possível determinar a presença de uma mistura de alcalóides, denominada MADCM AG (11,5mg), e uma fração denominada de Fr.AG I (9,2mg) (figura 7).

A fração MADCM II foi submetida à outra cromatografia em coluna de SEPHADEX LH-20 utilizando metanol como solvente, da qual obtiveram-se duas frações que foram submetidas a uma ressonância magnética nuclear de próton (RMN  $^1\text{H}$ ) para obtenção dos espectros para a determinação estrutural. Da primeira fração, foi identificado o alcalóide guanidínico mirabilina B (26mg) e a outra fração foi denominada Fr.AG II (17,7 mg) (figura 7).



A fração MAAC foi submetida a uma coluna cromatográfica em gel de sílica filtrante eluída com diclorometano, acetato de etila e metanol puros ou em misturas binárias em escala crescente de polaridade, obtendo-se, assim, 22 amostras que foram reunidas por análise comparativa por CCD em 15 frações. A fração mais purificada foi submetida a uma cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) eluída em metanol. As três frações obtidas, denominadas MAA-1, MAA-2 e Fr. AAG foram analisadas por RMN  $^1\text{H}$  onde, das frações MAA-1 e MAA-2 respectivamente, observou-se tratar de alcalóides guanidínicos isolados, ptilocaulina (PT) (34,0 mg) e 8b- $\beta$ -hidroxiptilocaulina (8HPT) (24,5 mg) (figura 7).

As frações Fr.AG I, Fr.AG II e a Fr.AAG foram analisadas por CCD comparativa e reunidas em uma única fração. Esta amostra foi submetida a uma coluna cromatográfica (CC) obtendo-se uma mistura de epímeros composta por 1,8a;8b,3a-dideidro-8 $\beta$ -hidroxiptilocaulina e um isômero 1,8a;8b,3a-dideidro-8 $\alpha$ -hidroxiptilocaulina que foi denominada MAMPI (6,0 mg) (figura 7).



**Figura 7** – Esquema mostrando a obtenção das misturas e compostos puros das frações MADCM e MAAC. As amostras dos balões desatacados em azul foram submetidas ao teste do MTT para verificação da atividade antiproliferativa.

## 2.2.4. Triagem das frações bioativas:

### 2.2.4.1 Estudos em células tumorais *in vitro*

#### 2.2.4.1.1. Manutenção da cultura de células:

As linhagens celulares fornecida pelo foram cultivadas em frascos para cultura (Corning, 75cm<sup>2</sup>, volume de 250mL), utilizando meio de cultura RPMI 1640 complementando com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos. As células foram incubadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, seguido da observação do crescimento das mesmas utilizando um microscópio de inversão a cada 24 horas. Quando necessário, as células foram repicadas em um novo meio de cultura em uma concentração de 0,5-1,0 x 10<sup>6</sup> céls/mL.

#### **2.2.4.1.2. Avaliação da citotoxicidade - Ensaio do MTT:**

A citotoxicidade em todas as etapas do fracionamento químico foi monitorada através do ensaio do MTT (Mosmann, 1983) utilizando as seguintes linhagens celulares de origem humana: HL-60 (leucemia aguda promielocítica), HCT-8 (carcinoma de cólon), SF-295 (glioblastoma) e MDA MB-435 (melanoma) fornecidas pelo US - National Cancer Institute (Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos).

As células em suspensão ou monocamadas foram plaqueadas em multiplacas de 96 cavidades numa concentração de  $2 \times 10^4$  células/100 $\mu$ L, para células suspensas e  $2 \times 10^3$  células/100 $\mu$ L para aderidas.

As amostras (extrato bruto, frações e compostos isolados) a serem testadas foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) e em seguida foram diluídas em serie e plaqueadas nas cavidades com a suspensão de células onde ficaram incubadas durante 72 horas em concentrações que variaram de 0,02  $\mu$ g/mL a 25  $\mu$ g/mL. Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas a 1000 rpm por 5 min, e o sobrenadante foi aspirado e descartado, logo em seguida cada cavidade recebeu 150 $\mu$ L da solução de MTT 0,5mg/mL (10% em meio RPMI 1640) e foi reincubada durante 3 horas nas mesmas condições das células. Em seguida, as placas foram novamente centrifugadas a 3000 rpm por 10 min., o sobrenadante foi aspirado e o precipitado ressuspendido em 150 $\mu$ L de DMSO. Para a quantificação do sal reduzido pelas mitocôndrias das células vivas, as absorbâncias foram lidas com auxílio de um espectrofotômetro de placas, em um comprimento de onda de 595 nm.

#### **2.2.4.1.3. Análise dos resultados:**

Os experimentos foram analisados segundo suas médias e seus respectivos erros-padrão de  $n$  experimentos. O cálculo das  $CI_{50}$  (concentração inibitória capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%) foram realizados por regressão não-linear no software GraphPad Prism.

#### **2.2.4.2. Avaliação do dano à membrana plasmática - Teste Hemolítico:**

Foi feita uma coleta de sangue de camundongos (*Mus musculus* Swiss) pela via do plexo ocular e imediatamente diluído em solução salina complementada com  $CaCl_2$  10 mM sob agitação para evitar coagulação. Após a coleta, o sangue foi centrifugado, (5000 rpm por 3 min) e o sobredandante descartado. O precipitado contendo os eritrócitos foi lavado três vezes em solução salina e diluído para se obter uma solução de eritrócitos (SE) a 2%. O material a ser testado foi diluído e plaqueado em placas de 96 cavidades, como controle negativo do ensaio foi utilizada solução salina, que foi adicionada aos poço da 1ª coluna e para controle positivo foi adicionado 20  $\mu$ L de Triton X-100 1% e 80  $\mu$ L de solução salina a serem adicionados as cavidades da 3ª coluna. A 2ª coluna recebeu em cada poço 50  $\mu$ L de solução salina e 50  $\mu$ L do veículo da substância testada (DMSO). Da 4ª a 11ª coluna receberam 100  $\mu$ L de solução salina enquanto que a 12ª coluna recebeu 180  $\mu$ L de solução salina e 40  $\mu$ L do material teste, em seguida foi retirado 100  $\mu$ L da solução e transferida para coluna anterior de modo que as concentrações ficaram reduzidas à metade. Logo após, a placa recebeu 100  $\mu$ L de solução de eritrócitos (SE) 2% e ficou incubado sobre agitação a temperatura ambiente.

Após 1 hora de incubação as placas foram centrifugadas a 5000 rpm por 3 min. e o sobrenadante foi transferido para outra placa a qual foi feita a leitura de absorbância a 540nm.

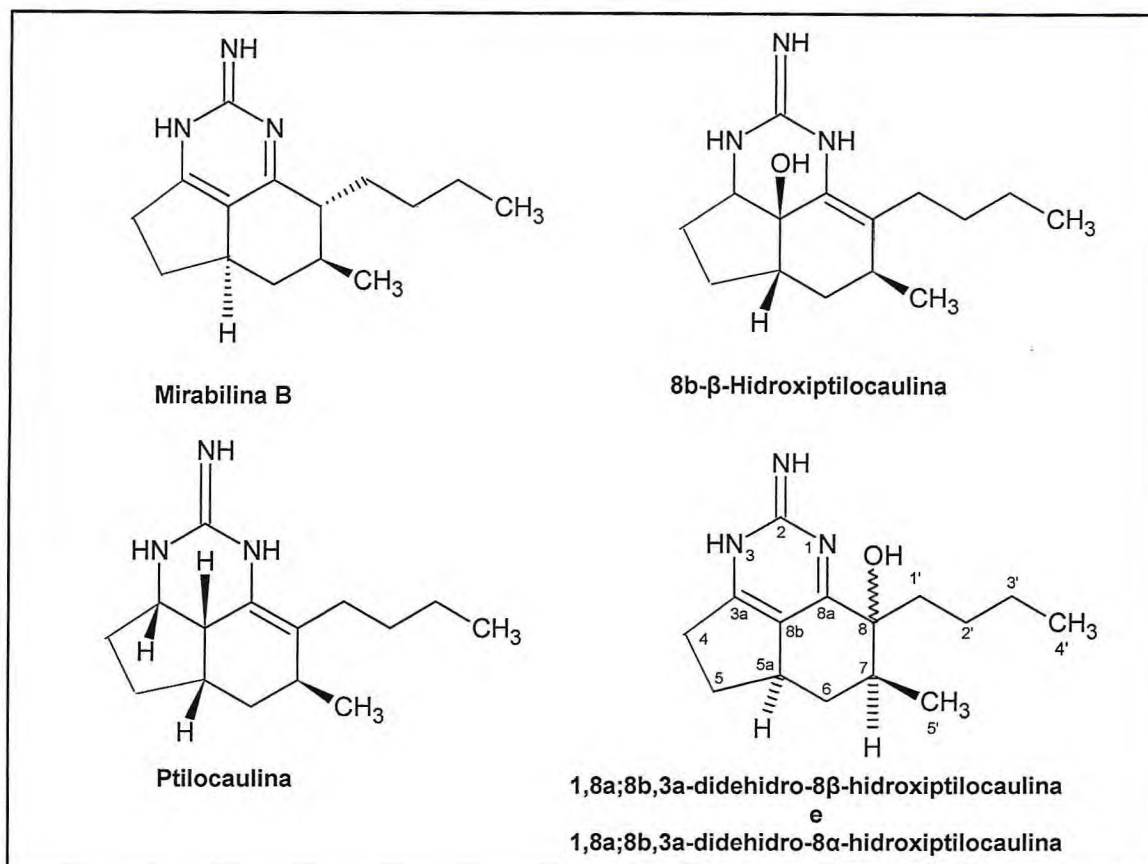
#### **2.2.4.2.1. Análise dos Resultados:**

A concentração efetiva média ( $CE_{50}$ ) foi determinada de maneira relativa aos controles positivo e negativo utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 (como descrito em Jimenez *et al.*, 2003).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Fracionamento bioguiado do extrato bruto e isolamento de compostos da espécie *Monanchora arbuscula*:

As frações MADCM e MAAC, submetidas a uma separação cromatográfica, possibilitou o isolamento de 3 alcalóides guanidínicos puros, ptilocaulina, 8b- $\beta$ -hidroxiptilocaulina e mirabilina B, e duas misturas, uma delas a MAMPI composta por dois epímeros (1,8a;8b,3a-didehidro-8 $\beta$ -hidroxiptilocaulina e 1,8a;8b,3a-didehidro-8 $\alpha$ -hidroxiptilocaulina), cujas estruturas foram determinadas por espectro de RMN  $^1\text{H}$  (figura 8). A outra MADCM AG mistura não teve suas estruturas identificadas.



**Figura 8** – Estruturas dos compostos: ptilocaulina, 8b-β-hidroxiptilocaulina, mirabilina B, 1,8a;8b,3a-didehidro-8β-hidroxiptilocaulina e 1,8a;8b,3a-didehidro-8α-hidroxiptilocaulina.

### 3.2. Avaliação do Potencial citotóxico:

As frações obtidas do fracionamento do extrato bruto da esponja marinha *M. arbuscula* foram avaliadas quanto ao seu potencial citotóxico através do método do MTT, em curva de concentrações variando entre 0,05 a 25µg/mL em 4 linhagens de células tumorais: HL-60, HCT-8, MDA-MB-435 e SF-295 após 72 horas de incubação, para obtenção a concentração inibitória média (CI<sub>50</sub>) das frações. As frações obtidas dos solventes de polaridade intermediária se mostraram bastantes promissoras para dar-se continuidade ao fracionamento químico, apresentando CI<sub>50</sub> variando de 1,13 µg/mL a 3,10 µg/mL (tabela 2).

**Tabela 2** – Atividade antiproliferativa do extrato bruto e das frações obtidas determinadas pelo método do MTT após 72hs de incubação. 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	MDA-MB-435	SF295
<b>Extrato Bruto</b>	2,18 1,848-2,567	5,42 3,716-7,897	1,74 1,513-2,000	7,55 6,415-8,886
<b>MADCM</b>	1,44 1,210-1,725	2,31 2,039-2,616	1,17 0,959-1,418	3,05 2,274-4,094
<b>MAAC</b>	1,31 1,193-1,447	1,87 1,678-2,083	1,13 0,956-1,331	2,08 1,937-2,244
<b>MAME</b>	2,50 2,065-3,021	2,86 1,972-4,162	4,22 3,509-5,066	7,04 5,353-9,269
<b>MAEP</b>	7,72 6,094-9,768	>25	15,64 14,43-16,95	>25

As frações MADCM e MAAC mostraram-se bastante promissoras para continuidade do estudo e foram selecionadas para o fracionamento. Três compostos puros isolados, uma mistura não identificada e uma mistura de epímeros foram obtidas e submetidas ao ensaio do MTT nas quatro linhagens tumorais incubadas durante 72 horas para se obter as suas  $CI_{50}$ . Os resultados estão descritos na tabela 3, evidenciando uma atividade mais pronunciada das frações MADCM II, seguida por MADCM I. Dentre os compostos puros, tanto a ptilocaulina quanto a 8b- $\beta$ -hidroxiptilocaulina apresentaram atividade antiproliferativa frente às linhagens testadas, sendo a ptilocaulina mais ativa com  $CI_{50}$  variando de 1,10  $\mu\text{g/mL}$  em células HL-60 a 11,26  $\mu\text{g/mL}$  em células da linhagem SF-295.



**Tabela 3** – Frações ativas, misturas e compostos puros obtidos do extrato bruto de *M. arbuscula* testadas em linhagens celulares tumorais pelo método do MTT após 72hs de incubação. Os valores abaixo se referem as  $CI_{50}$  e IC 95% dados em  $\mu\text{g/mL}$  para frações

Amostras	MTT			
	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	IC 95%			
	HL-60	HCT-8	MDA-MB-435	SF 295
MADCM I	6,74	20,40	8,08	> 25
	5,441 – 8,350	18,07 – 23,03	7,242 – 9,028	
MADCM II	3,35	15,10	5,24	20,56
	2,503 – 4,489	12,71 – 17,94	4,607 – 5,949	18,88 – 22,38
MADCM III	> 25	>25	23,59	> 25
			11,20 – 49,67	
MADCM AG	>25	>25	>25	>25
MAMPI	>25	>25	>25	>25
Mirabilin B	> 5	> 5	> 5	> 5
PT	1,10	4,37	1,84	11,26
8HPT	1,82	8,89	3,51	18,85

### 3.3. Avaliação quanto ao dano em membrana plasmática

O extrato bruto obtido da espécie *M. arbuscula* assim com as suas frações, misturas e compostos obtidos foram submetidos ao ensaio hemolítico para avaliar o seu dano a membrana plasmática, sendo testadas durante um período de incubação de 1h em eritrócitos de camundongos *Mus musculus* em concentrações que variaram de 8 a 1000 µg/mL. A fração MAAC (acetato de etila) concentrou em maior grau a atividade hemolítica observada no extrato bruto. Os compostos puros ptilocaulina e 8b-β-hidroxiptilocaulina também apresentaram uma atividade hemolítica elevada e moderada, respectivamente (tabela 4).

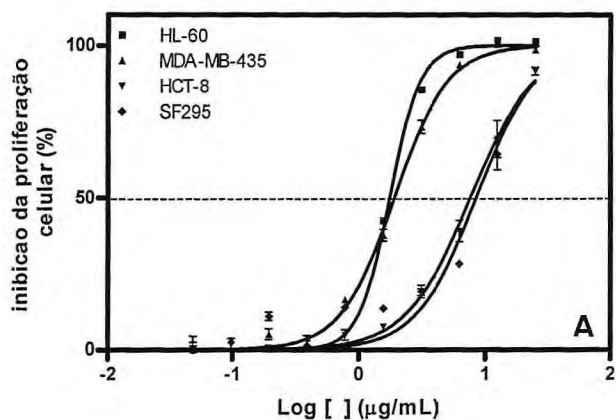
**Tabela 4** – Valores de CE<sub>50</sub> e IC 95% referentes ao teste de hemólise em eritrócitos murinos após 1h de incubação das frações e compostos puros isolados (µg/mL) ativos no ensaio do MTT

Amostras	Hemólise	Amostras	Hemólise
	CE <sub>50</sub> (µg/mL) IC 95%		CE <sub>50</sub> (µg/mL) IC 95%
Extrato Bruto	37,54 29,99 – 47,00	MADCM I	195,5 193.9 - 197.1
MADCM	146,4 135,0-158,6	MADCM II	111,7 108.2 - 115.3
MAAC	80,02 59,54-107,6	PT	87,17 79.06 - 96.12
MAME	132,4 110,9-158,1	8HPT	152,5 138.6 - 167.9
MAEP	> 500		

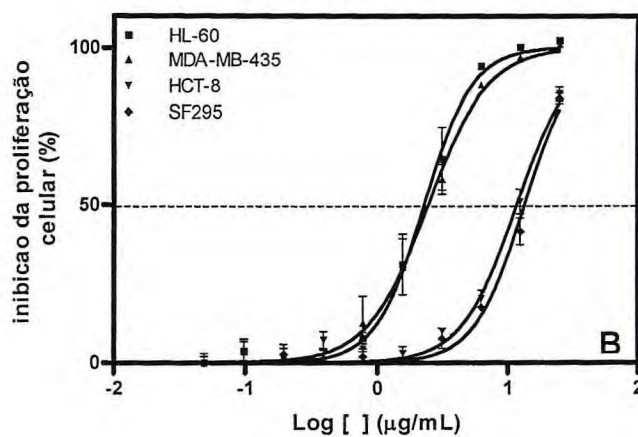
A figura 9 abaixo representa, comparativamente, as curvas de concentrações obtidas dos ensaios MTT e hemólise dos compostos isolados.

### MTT

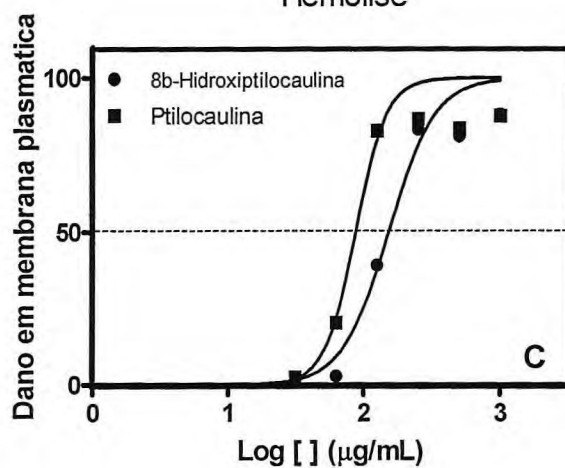
#### Ptilocaulina



#### 8b- $\beta$ -Hidroxiptilocaulina



### Hemólise



**Figura 9** - Gráfico representativo da curva de concentrações inibitórias e efetivas médias determinadas pelos ensaios do MTT e hemólise dos compostos PT e 8HPT.

### 3.4. Análise dos resultados obtidos

Os resultados de  $CI_{50}$  e  $CE_{50}$  dos ensaios de MTT e hemólise respectivamente foram relacionados quanto à razão de 8HPT/PT, onde percebemos que as razões obtidas apresentam pouca variação entre as linhagens e os modelos estudados, como mostrados na tabela 5.

**Tabela 5** – Valores de  $CI_{50}$  e  $CE_{50}$  dos ensaios de MTT e hemólise respectivamente, relacionando quanto à razão de atividade entre PT e HPT expressos em  $\mu\text{g/mL}$

Amostras	MTT				Hemólise
	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )				$CE_{50}$
	IC 95%				( $\mu\text{g/mL}$ )
	HL-60	HCT-8	MDA-MB-435	SF-295	IC 95%
PT	1,10	4,37	1,84	11,26	87,17
8HPT	1,82	8,89	3,51	18,85	152,5
8HPT/ PT	<b>1,65</b>	<b>2,03</b>	<b>1,91</b>	<b>1,67</b>	<b>1,75</b>

#### 4. DISCUSSÃO

Os estudos com organismos marinhos coletados no litoral cearense visando a prospecção de substâncias bioativas, são ainda incipientes, mas já ressaltam o potencial anticâncer de ascídias e esponjas, além do alto grau de endemismo da região (Jimenez *et al.*, 2003; 2004; Wilke, 2005).

Recentemente, Ferreira e colaboradores (2007) realizaram um *screening* de 22 espécies de esponjas coletadas no Parque Estadual Marinho Pedra da Risca do Meio, Ceará, avaliando o potencial citotóxico, hemolítico e antimetabólico em ovos de ouriço-do-mar (*Lytechinus variegatus*) dos extratos etanólicos destas espécies. Das espécies coletadas 6 delas mostraram-se promissoras quanto ao seu potencial citotóxico nas linhagens de células tumorais testadas (HL-60, MDA-MB-435, HCT-8, SF-295), sendo que as espécies *Monanchora arbuscula*, *Amphimedon compressa* e *Geodia corticostylifera* apresentaram-se mais potentes na inibição do crescimento celular com  $CI_{50}$  variando de 1,601 a 2,032  $\mu\text{g/mL}$ , 1,596 a 2,962  $\mu\text{g/mL}$  e menor que 1,56  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente.

Os extratos das espécies *Agelas clathrodes*, *Agelas* sp., *Pseudosuberites* sp.n. e *Hyattella intestinalis* apresentaram atividade moderada quanto ao seu potencial citotóxico nas linhagens celulares testadas. As espécies *Monanchora arbusucula* e *Geodia Corticostylifera* foram as que apresentaram maior atividade hemolítica em eritrócitos murinos com

concentrações efetivas médias ( $CE_{50}$ ) de 37,54  $\mu\text{g/mL}$  e 55,10  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente (Ferreira *et al.*, 2007).

Quanto à inibição do desenvolvimento embrionário em ovos de ouriço-do-mar apenas as espécies *Niphates* sp., *Pseudosuberites* sp.n. e *Drummacidon reticulatus* apresentaram pouca ou nenhuma atividade em concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$ . Já as espécies *Monanchora arbuscula*, *Amphimedon compressa*, *Agelas dispar*, *A. clathrodes*, *Aplysina* sp., *Aplysina* sp.n.3, *Aiolochoia crassa*, *Ircinia strobilina* e *Hyattella intestinalis* apresentaram maior efeito inibitório da divisão celular (Ferreira *et al.*, 2007).

Um estudo realizado por Jimenez e colaboradores (2004) avaliou o potencial citotóxico, antimitótico e antimicrobiano de extratos hidro-metanólicos obtidos de 8 espécies de esponjas coletadas na zona intertidal da praia de Flexeiras, Ceará (Trairi). Das 8 espécies estudadas 7 apresentaram algum tipo de atividade biológica, sendo a inibição do desenvolvimento de ovos de ouriço-do-mar e a atividade antiproliferativa em células tumorais mais freqüentemente 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 0,15 mg/mL; quanto a atividade antimitótica no desenvolvimento embrionário de ovos de ouriço-do-mar foi mais acentuado em 3ª divisão e fase de blástula com concentrações inibitórias ( $CI_{50}$ ) de 107,8  $\mu\text{g/mL}$  e 62,5  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente, enquanto que sua atividade antiproliferativa em linhagens de células tumorais variaram com  $CI_{50}$  de 2,8 a 31,9  $\mu\text{g/mL}$ .

Um estudo realizado por Wilke (2005) com a espécie *Ircinia felix* coletada no Parque Estadual Pedra da Risca do Meio, Ceará, avaliou o potencial citotóxico de frações obtidas do extrato hidroalcoólico bruto da espécie em um fracionamento bioguiado e mostrou que as frações de polaridades intermediárias obtidas por diclorometano, clorofórmio e as obtidas por acetato de etila, apresentavam uma atividade antiproliferativa bastante promissora.

Tendo em vista os resultados promissores observados para o extrato bruto da espécie *M. arbuscula* coletada no PEMPRM, decidiu-se por investigar mais adiante as suas propriedades químicas e farmacológicas, realizando o fracionamento químico deste extrato bruto direcionado pela atividade citotóxica das amostras obtidas em 4 linhagens de células tumorais.

O ensaio do MTT é uma ferramenta muito importante no estudo de bioprospecção de compostos citotóxicos, que têm uma forte correlação com atividade antiproliferativa. Este é um ensaio colorimétrico quantitativo baseado na determinação indireta da quantidade de células presentes a partir da conversão do MTT, um sal amarelo de tetrazolina, em formazan, um composto de púrpura, pelas células metabolicamente viáveis (Fornelli *et al.*, 2004).

Das frações obtidas das primeiras partições com solventes orgânicos do extrato, as frações MAME (metanólica), MADCM (diclorometânica) e MAAC (acetato de etila) mostraram-se ativas nas linhagens testadas, sendo que as frações de polaridade intermediária – MADCM e MAAC – mostraram uma atividade semelhante e mais pronunciada (Tabela 2). Estas frações, quando comparadas por análise CCD, mostraram, também, serem semelhantes

químicas. Vale ressaltar que, fracionamentos bioquímicos de extratos hidroalcoólicos de invertebrados realizados anteriormente pelo nosso grupo de estudos, as frações de polaridade intermediária são freqüentemente as mais promissoras quanto à atividade citotóxica (Wilke, 2005; Jimenez *et al.*, 2007).

As frações MADCM e MAAC foram, então, submetidas a várias separações cromatográfica de onde obtivemos 3 compostos puros e 2 misturas. Por análises de RMN <sup>1</sup>H pode-se constatar que se tratavam de alcalóides guanidínico. Outros estudos já foram realizados no sentido de obterem-se compostos com algum tipo de atividade biológica da espécie *M. arbuscula*, também comprovaram ser esta espécie uma fonte em alcalóides guanidínicos biologicamente ativos.

Estudos realizados por Muricy e colaboradores (1993) avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos metanólicos de 21 espécies de esponjas coletadas nas praias do Forno e Arraial do cabo, Rio de Janeiro – RJ. Este estudo mostrou que 19 dos 21 extratos testados apresentaram-se potencialmente interessantes quanto a alguma das atividades avaliadas. Das esponjas estudadas, o extrato metanólico obtido das espécies *M. arbuscula* e *Arenosclera* sp. apresentaram potente atividade antibacteriana e antifúngica, tendo sido este o primeiro relato de atividade anti-infecciosa da espécie *M. arbuscula*.

Recentemente, Kossuga e colaboradores (2007) realizaram estudos químicos e farmacológicos para determinar o potencial citotóxico, antibacteriano e antimicobacteriano do extrato metanólico da espécie *M.*



*arbuscula*. Este extrato mostrou-se potente em todas as atividades investigadas.

Neste mesmo estudo Kossuga e colaboradores (2007) relatam separação química deste extrato, de onde isolaram um alcalóide guanidínico, a isoptilocaulina, que foi testado quanto a sua atividade antibacteriana. A isoptilocaulina encontrada no extrato metanólico da espécie *M. arbuscula* apresentou como um potente antibiótico contra linhagens de *Staphylococcus aureus* resistentes a cloranfenicol.

Os alcalóides guanidínicos são compostos conhecidos na literatura por apresentarem uma vasta variedade de atividades biológicas. Eles são freqüentemente encontrados em espécies do gênero *Monanchora*, *Crambe*, *Ptilocaulis* e *Batzella*. Alguns autores consideram que os estes 4 gêneros, e mais enfaticamente, os 3 primeiros, poderiam ser eventualmente agrupados em um único gênero (*Crambe*, por razões de prioridade). Além dos caracteres morfológicos e estruturais, as semelhanças químicas entre essas espécies, inclusive pela presença recorrente dos alcalóides guanidínicos, são fortes argumentos para embasar essa reunião (Kossuga *et al.*, 2007; Patil *et al.*, 1997; Van Soest *et al.*, 1996). Tavares e colaboradores (1994) sugerem que a presença do alcalóide guanidínico crambescidina 800 nos gêneros *Monanchora* e *Crambe* possa estabelecer uma relação entre ambos os gêneros.

A isoptilocaulina é um composto homólogo à ptilocaulina, que é também um alcalóide guanidíco tricíclico que apresenta uma pronunciada atividade antimicrobiana e citotóxica. Este alcalóide foi primeiramente isolado da esponja

caribenha *Ptilocaulis spiculifer*, contudo este composto já foi isolado de outros gêneros de esponjas incluindo o gênero *Monanchora* (Patil *et al.*, 1997).

Ruben e colaboradores (1989) realizaram um estudo para avaliar o potencial citotóxico da ptilocaulina extraída de *P. spiculifer* em 14 linhagens de células tumorais humanas e murinas e teve como resultados uma pronunciada inibição do crescimento celular avaliado pelo método do MTT em 4 linhagens celulares, com  $CI_{50} \leq 0,1 \mu\text{g/mL}$ , e apresentou uma inibição moderada para 6 linhagens celulares com um intervalo de  $CI_{50}$  entre  $0,1 \mu\text{g/mL} < CI_{50} \leq 1 \mu\text{g/mL}$ . Neste estudo também se observou uma maior seletividade do composto por linhagens de melanomas, e, por outro lado, uma menor atividade em linhagens de adenocarcinomas de cólon e células linfóides normais.

Esse estudo também fez uma comparação das médias da  $CI_{50}$  da ptilocaulina entre as  $CI_{50}$  de 10 compostos, sendo 5 naturais e 5 sintéticos, atualmente usados na clínica. Por semelhança de perfil de atividade, os autores associaram a ptilocaulina a 2 dos compostos naturais (vincristina e bleomicina) e a 3 dos produtos sintéticos (5-flourouracil, citarabina e metrotexato) (Ruben *et al.*, 1989).

No presente trabalho, a ptilocaulina (PT) isolada da *M. arbuscula* coletada do PEMPRM apresentou  $CI_{50}$  superiores (Tabela 3, pág 27) às citadas no trabalho previamente mencionado, porém o perfil da sua atividade citotóxica apresentou-se de um modo semelhante ao descrito por Ruben e colaboradores (1989). Ainda que testada em um menor número de linhagens, a ptilocaulina mostrou alguma seletividade entre as linhagens, tendo sido mais ativa em linhagens de leucemia (HL-60) e melanoma (MDA-MB-435), com  $IC_{50}$

cerca de 10 vezes menor que nas linhagens de cólon (HCT-8) e glioblastoma. (SF-295).

O composto 8b-β-hidroxiptilocalina (8HPT) já isolado de *M. arbuscula*, foi descrita anteriormente por Tavares e colaboradores no ano de 1994, contudo não há relatos anteriores de estudos visando alguma atividade biológica (Tavares *et al.*, 1994). No presente estudo, esse composto apresentou atividade citotóxica mais pronunciada nas linhagens de leucemia (HL-60) e melanoma (MDA-MB-435) e menos pronunciada nas linhagens de cólon (HCT-8) e glioblastoma(SF-295). Os valores de IC<sub>50</sub> encontrados são bastante próximos aos determinados para a ptilocalina presentemente estudada, entretanto, a razão 8HPT/PT é em média 1,8X nas linhagens avaliadas.

Os compostos acima também foram avaliados quanto ao seu potencial em causar danos à membrana plasmática em eritrócitos isolados de camundongos (*Mus musculus* Swiss). Ambos os compostos PT e 8HPT apresentaram atividade hemolítica com CE<sub>50</sub> de 87,17 µg/mL e 152,50 µg/mL respectivamente, sendo evidenciada uma atividade mais pronunciada para o composto PT em relação ao 8HPT, contudo este efeito hemolítico é observado em concentrações, várias vezes maior que aquelas determinadas no ensaio do MTT.

Os alcalóides isolados e identificados no presente trabalho apresentam sua cadeia estrutural muito semelhante, contudo algumas variações podem ser observadas em relação à atividade biológica destes compostos. Os compostos PT e 8HPT apresentam estruturas bastante semelhantes, contudo a 8HPT

diferencia da PT por apresentar uma hidroxila no carbono 8b. A atividade citotóxica da 8HPT é sempre menor em relação à PT e pode estar relacionada à presença desta hidroxila. É interessante observar que ambas as moléculas apresentam o mesmo perfil de atividade, contudo o composto PT apresenta recorrentemente uma maior atividade em razão aproximada de 1,8 vezes. Já os compostos mirabilina B e a mistura de epímeros (1,8a;8b,3a-didehidro-8 $\beta$ -hidroxiptilocaulina e 1,8a;8b,3a-didehidro-8 $\alpha$ -hidroxiptilocaulina) apresentam em sua estrutura duplas ligações que podem estar relacionadas a ausência de atividade destes compostos.

O composto mirabilina B isolado neste trabalho não apresentou atividade significativa quanto ao seu potencial citotóxico frente às linhagens testadas o que 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 antimicrobiana, citotóxica, anti-HIV e antituberculose. Este composto não apresentou atividade citotóxica contra 14 linhagens de células tumorais testadas e nem mostrou qualquer efeito antiviral, contudo o composto exibiu uma potente atividade antifúngica contra *Cryptococcus neoformans* com  $CI_{50}$  de 7,0  $\mu\text{g/mL}$  e uma pronunciada atividade antiprozoária contra *Leishmania donovani* com  $CI_{50}$  igual a 17,0  $\mu\text{g/mL}$  (Hua *et al.*, 2004).

A mistura de epímeros composta por 1,8a;8b,3a-didehidro-8 $\beta$ -hidroxiptilocaulina e o seu isômero 1,8a;8b,3a-didehidro-8 $\alpha$ -hidroxiptilocaulina haja vista estudados por Hua e colaboradores em 2004, avaliaram o potencial citotóxico, antiviral, antimicrobiano e antituberculose desta mistura, que se

mostrou ativo apenas contra o protozoário causador de malária, *Plasmodium falciparum*, com  $CI_{50}$  igual a 3,8  $\mu\text{g/mL}$ . Os resultados obtidos neste estudo também mostraram que esta mistura de epímeros não apresenta atividade citotóxica em linhagens celulares tumorais.

Este estudo é parte de um trabalho pioneiro que visa conhecer o potencial farmacológico das espécies de invertebrados marinhos da costa do Ceará e, mais especificamente, das esponjas marinhas do Parque Estadual Marinho Pedra da Risca do Meio. Etapas posteriores deste trabalho já estão em andamento e visam esclarecer os mecanismos de ação citotóxica das moléculas aqui estudadas utilizando outros modelos celulares e diferentes alvos biológicos. Entretanto, os resultados aqui apresentados sedimentam a importância dos estudos dos produtos marinhos como uma inovadora fonte de moléculas bioativas, assim como fornecem novos dados acerca da fauna marinha cearense, ainda pouco estudada quanto ao seu potencial farmacológico.

## 5. CONCLUSÃO

O Parque Estadual Marinho Pedra da Risca do Meio vem demonstrando ser uma importante fonte de produtos naturais bioativos na costa cearense. O fracionamento bioguiado do extrato bruto da esponja marinha *Monanchora arbuscula* revelou que esta espécie é rica em compostos citotóxicos e abriga alcalóides guanidínicos com interessante atividade antiproliferativa em células de linhagens tumorais.

Os compostos pitlocaulina (PT) e 8b- $\beta$ -hidroxiptilocaulina (8HPT) isolados da fração MAAC (acetato de etila) apresentaram uma atividade citotóxica contra as linhagens de células tumorais, mostrando, inclusive, uma especificidade para a linhagem de melanoma (MDA MB 435) e leucemia (HL-60), sendo o composto PT em média 1,8 vezes mais ativo que o composto 8HPT, e apresentando atividade hemolítica, porém em concentrações bem superiores as encontradas para suas  $CI_{50}$ .

## 6. BIBLIOGRAFIA

BALANDRIN, M.F., KINGHORN, A.D., FARNSWORTH, N.R., Plant-derived natural products in drug discovery and development: an overview. In: Kinghorn AD, Balandrin MF (Editors) *Human Medicinal Agents from Plants*. Edited by North Carolina, USA: Oxford University Press USA; **American Chemical Society Symposium Series**. 2-12, 1993.

Bergman W & Feeney RJ Nucleosides of sponges. **Journal of Organic Chemistry**. Vol.16, 981-987, 1951.

BHARGAVA, P., MARSHALL, J.L., DAHUT, W., RIZVI, N., TROCKY, N., WILLIAMS, J.I., HAIT, H., SONG, S., HOLROYD, K.J., HAWKINS, M.J., A phase I and pharmacokinetic study of squalamine, a novel antiangiogenic agent, in patients with advanced cancers. **Clinical cancer research**. Vol. 7, 3912-3919, 2001.

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

CRAGG, G.M., & NEWMAN, D.J., Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources. **Cancer Investigation**. Vol.17, 153-163, 1999.

CRAGG, G.M. & NEWMAN, D.J., Antineoplastic agents from natural sources: achievements and future directions. **Expert Opinion on Investigational Drugs**. 9 12, 1-15, 2000.

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**. Vol. 66, 1490-1494, 2003.

CLINICAL TRIALS - <http://www.clinicaltrials.gov/>. Acessado em dezembro de 2007.

DELALOGUE, S., YOVINE, A., TAAMMA, A., RIOFRIO, M., BRAIN, E., RAYMOND, E., COTTU, P., GOLDWASSER, F., JIMENO, J., MISSET, J.L., MARTY, M., CVITKOVIC, E., Ecteinascidin-743: a marine derived compound in advanced, pretreated sarcoma patients-preliminary evidence of activity. **Journal of clinical oncology**. Vol 19, 1248-1255, 2001.

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

FARNSWORTH, N.R., Medicinal plants in therapy. *Bulletin of the WHO* 63. Vol. 6, 965 – 981, 1985.

FERREIRA, E.G., WILKE, D.V., JIMENEZ, P.C., PORTELA, T.A., HAJDU, E., PESSOA, C.O., MORAES, M.O., LOTUFO, L.V.C., 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*. IN PRESS, 2007.

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

HAMILTON, M.A., RUSSO, R.C., THURSTON, R.V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environment Science Technology*. Vol. 11, 714–719, 1977.

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

HICKMAN, C.P., ROBERTS, L.S., LARSON, A. Princípios Integrados de Zoologia. *Ed. Guanabara Koogan S.A.*. Rio de Janeiro – RJ, Ed. 11, pp 846, 2004.

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*. Vol.12, 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*. Vol. 63, 11179-11188, 2007.

INCA – Ministério da Saúde (2006) <http://www.inca.gov.br/>. acessado em dezembro de 2006.

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. *Arquivo de Ciências do Mar*. Vol 37, 85-91, 2004.

JIMENEZ, P.C., WILKE, D.V., TAKEARA, R., LOTUFO, T.M.C., PESSOA, C.O., MORAES, M.O., LOPES, N.P. ; LOTUFO, L.V.C. Preliminary studies on the cytotoxic activity of a dichloromethane extract and fractions obtained from *Eudistoma vannamei* (Tunicata : Ascidiacea). *Comparative Biochemistry and Physiology. A, Molecular & Integrative Physiology*. IN PRESS, 2007.



JIMENEZ, P.C., FORTIER, S.C., LOTUFO, T.M.C., PESSOA, C., MORAES, M.E.A., MORAES, M.O., COSTA-LOTUFO, L.V. Biological activity in extracts of ascidians (Tunicata Ascidiacea) from the northeastern Brazilian coast. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. Vol. 287, 93-101, 2003.

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**. Vol. 30, Nº 5, 1194-1202, 2007.

LI, H., MATSUNAGA, S., FUSEYANI, N., Halicylindramides A-C, antifungal and cytotoxic depsipeptides from the marine sponge *Halichondria cylindrata*. **Journal of medicinal chemistry**. Vol. 38, 338-343, 1995.

MANN, J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. **Nature Reviews Cancer**. Vol. 2, 143-148, 2002.

MAYER, A.M.S. & GUSTAFSON, K.R. Marine pharmacology in 2003-2004: Anti-tumor and cytotoxic compounds. **European Journal of Cancer**. Vol. 42, 2241-2270, 2006.

MOSMANN, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**. Vol. 16, 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**. Vol. 57 (4), 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**. Vol. 11, 1725-1756, 2004.

NEWMAN, D.J., CRAGG, G.M., Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. **Journal of Natural Products**. Vol. 67, 1216-1238, 2004.

PATIL, A.D., KUMAR, N.V., KOKKE, W.C., BEAN, M.F., FREYER, A.J., BROSSE, C., MAI, S., TRUNEH, A., FAULKNER, D.J., CARTE, B., BREEN, A.L., HERTZBERG, R.P., JOHNSON, R.K., WESTLEY, J.W., POTTS, B.C.M., Novel alkaloids from the sponge *Batzella* sp.: Inhibitors of HIV gp 120-Human CD4 Binding. **The Journal of Organic Chemistry**. Vol. 60, 1182-1188, 1995.

PATIL, A.D., FREYER, A.J., OFFEN, P., BEAN, M.F., JOHNSON, R.K., Three new tricyclic guanidine alkaloids from the sponge *Batzella* sp.. **Journal of Natural Products**. Vol. 60, 704-707, 1997.

PROJETO NETUNO - Disponível em  
[http://www.projetonetuno.com.br/images/mapa\\_gran.gif](http://www.projetonetuno.com.br/images/mapa_gran.gif). Acessado em  
 15/11/2007. Modificado por Diego Veras Wilke.

PROKSCH, P., EDRADA, R.A., EBEL, R., Drugs from the sea - current status and microbiological implications. ***Applied microbiology and biotechnology***. Vol 59, 125-134, 2002.

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***. Vol. 7, 147-154, 1989.

RUPPERT, E.E. & BARNES, R.B., (1996) Zoologia dos Invertebrados. ***Ed. Rocca Ltda***. 6ª edição. São Paulo.

SCHWARTSMANN, G., ROCHA, A.B., BERLINCK, R.G.S., JIMENO, J., Marine organisms as a source of new anticancer agents. ***Lancet Oncology***. Vol.2, 221-225, 2001.

SHIN, C. & TEICHER B.A., Cryptophycins: A Novel Class of Potent Antimitotic Antitumor Depsipeptides. ***Current Pharmaceutical Design***. Vol. 7, Nº. 13, 1259-1276, 2001.

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

SOEST, R.W.M. van, BRAEKMAN, J.C., FAULKNER, D.J., HAJDU, E., HARPER, M.K., VACELET, J., The genus *Batzella*: a chemosystematic problem. ***Biologie***. Vol. 66, 89-101, 1996.

SOEST, R.W.M. van, Family Cambreidae Lévi, 1963. In Hooper, j.; Soest, R.W.M. van (Eds.). Vol. 1, pp 547 - 555 Systema Porifera. A guide to the classification of sponges, (Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York) pp 1101, 2002.

TAVARES, R., DALOZE, D., BRAEKMAN, J.C., HAJDU, E., MURICY, G., SOEST, R.W.M. VAN. Isolation os Crambescidin 800 from *Monanchora arbuscula* (Porifera). ***Biochemical Systematics and Ecology***. Vol. 22, Nº 6, 645-646, 1994.

VAISHAMPAYAN, U., GLODE, M., DU, W., KRAFT, A., HUDES, G., WRIGHT, J., HUSSAIN, M., Phase II study of Dolastatin-10 in patients with hormona-refractory metastatic prostate adenocarcinoma. ***Clinical cancer research***. Vol. 6, 4205-4208, 2000.

VARTERASIAN, M.L., PEMBERTON, P.A., HULBURD, K., RODRIGUEZ, D.H., MURGO, A., AL-KATIB, A.M., Phase II study of bryostatin 1 in patients with relapsed multiple myeloma. ***Investigational new drugs***. Vol. 19, 245-247, 2001.

VERMES I., HAANEN C., STEFFENS-NAKKEN H., REUTELINGSPERGER C.,  
A novel assay for apoptosis: flow cytometric detection of phosphatidylserine  
expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V.  
***Journal of immunological methods***. Vol. 184, 39-51, 1995.

WILKE, D.V., Fracionamento bioquímico do extrato hidroalcoólico da esponja  
marinha *Ircinia felix* (Porífera, Demospongiae) encontrada no Parque Estadual  
Marinho Pedra da Risca do Meio (Fortaleza, CE). Monografia submetida à  
coordenação do curso de ciências biológicas, UFC. pp 62, 2005.