



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

THICIANA DA SILVA SOUSA

**MICRO-ORGANISMOS MARINHOS PRODUTORES DE
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS BIOLÓGICAMENTE ATIVOS**

FORTALEZA-CE

2013

THICIANA DA SILVA SOUSA

MICRO-ORGANISMOS MARINHOS PRODUTORES DE METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS BIOLÓGICAMENTE ATIVOS

Tese submetida à coordenação do Curso de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Otília Deusdênia Loiola Pessoa

FORTALEZA-CE

2013

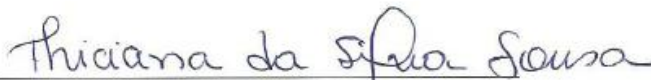
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

S698m Sousa, Thiciana da Silva.
 Micro-organismos marinhos produtores de metabólitos secundários biologicamente ativos. /
 Thiciana da Silva Sousa. – 2013.
 227 f. : il. color., enc. ; 30 cm.


 Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Química,
 Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2013.
 Orientação: Profa. Dra. Otilia Deusdênia Loiola Pessoa.


 1. Micromonospora. 2. Streptomyces. 3. Pseudoalteromonas. I. Título.

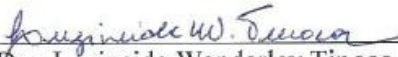
Esta Tese foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutor em Química, área de concentração Química Orgânica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e em cuja Biblioteca Central encontra-se à disposição dos interessados.



Thiciana da Silva Sousa

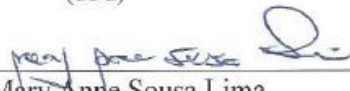
Tese aprovada em: **26/06/2013**


Dra. Otilia Deusdênia Loliola Pessoa
(Orientadora - UFC)


Dr. Ian Castro-Gamboa
(UNESP)


Dra. Luzineide Wanderley Tinoco
(UFRJ)


Dr. Marcos Carlos de Mattos
(UFC)


Dra. Mary Anne Sousa Lima
(UFC)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Elizabete e Nonato, que sempre lutaram para que eu tivesse a melhor educação, sempre me incentivaram a buscar os meus sonhos e sempre me deram muito amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por todos os momentos maravilhosos que tenho em minha vida, pela força concedida nesta jornada, por esta conquista realizada, e por tudo que ainda ele irá me ajudar;

Aos meus pais, Elizabete e Nonato, que são meu referencial de amor e honestidade, que sempre batalharam para proporcionar uma vida digna para nossa família. Eles são os grandes responsáveis por essa conquista;

As minhas irmãs, Diana e Thatiana, por todos os momentos de apoio e compreensão na construção desse sonho;

Ao meu namorado, amigo e companheiro George Melo pelo carinho, compreensão, amor e solidariedade.

A minha orientadora, Profa. Dra. Otília D. L. Pessoa, pelo exemplo de dedicação ao trabalho e orientação simples e clara. Obrigada pelos ensinamentos, pela confiança e por sua amizade;

Ao Prof. Dr. Edilberto R. Silveira, por conceder a realização dos espectros de RMN e pela sua disposição em cooperar com este trabalho;

Aos professores do curso de pós-graduação em química (UFC), pela contribuição teórica ao meu trabalho;

A Prof. Dra. Letícia V. C. Lotufo e aos seus alunos Isabeli, Paula Jimenez, Paula Abreu e Elton Ferreira pela parceria no desenvolvimento deste trabalho, principalmente na realização das atividades biológicas;

Ao Prof. Dr. Raimundo Braz-Filho pela ajuda na determinação estrutural das substâncias isoladas;

Ao Prof. Dr. Fernando Reyes e aos funcionários da Fundacion Medina, em especial, Gloria e Jesus Martins pelos conhecimentos repassados e por toda ajuda nos momentos mais difíceis;

Aos operadores do CENAUREM, IV e EM pelos espectros obtidos;

Aos amigos da família LAFIPLAM, Bruno, Pedro, Chagas, Alison, Isabel, Ceíça, Hozana, Max, Karine, Taynara, Andreza, Gustavo, Patricia, Paula, Mariano, Nayara, pela amizade, convívio e pelos momentos de descontração no laboratório;

Aos amigos Leonardo e Ayla por toda ajuda e pelos momentos de felicidade;

Aos meus amigos de longa data Karisia Sousa, Ribamar Brasil e Luciana Bertini, pela amizade sincera e pelo companherimo em todos os momentos, bons e ruins;

As amigas Patricia Martinez, Maria Cândida e Patricia Graça que me fizeram compainha na Espanha e tornaram minha estagia mais divertida;

Aos órgãos CNPq, CAPES e FUNCAP pelo suporte financeiro ao curso de pós-graduação e pelas bolsas de estudo concedidas;

A todos que de alguma forma contribuíram, direto ou indiretamente para a realização desse trabalho, muito obrigada.

RESUMO

Este trabalho descreve o estudo químico e biológico dos extratos das bactérias marinhas *Pseudoalteromonas* sp., *Micromonospora* sp., *Streptomyces* sp. e *Kocuria* sp., visando o isolamento e a elucidação estrutural de novos constituintes bioativos. A investigação química realizada com a bactéria *Pseudoalteromonas* sp. resultou no isolamento de um pigmento vermelho identificado como prodigiosina e de dois ácidos biliares conhecidos como ácido desoxicólico e ácido cólico. A prodigiosina foi testada frente a quatro linhagens de células tumorais e apresentou valores de IC₅₀ semelhantes ao padrão positivo. O estudo químico de *Micromonospora* sp. resultou no isolamento de quatro novas antraciclinonas: 4,6,11-triidroxi-9-propiltetraceno-5,12-diona; 4-metoxi-9-propiltetraceno-6,11-diona; 7,8,9,10-tetraidro-9-hidroxi-4-metoxi-9-propiltetra-ceno-6,11-diona e 10β-metoxicarbonil-7,8,9,10-tetraidro-4,6,7α,9α,11-pentaidroxi-9-propil-tetraceno-5,12-diona. Esses compostos foram avaliados quanto a sua atividade anti-tumoral frente a linhagem celular HCT-8, dois dos quais mostraram citotoxicidade moderada com valores de IC₅₀ de 12,74 e 6,18 μM. O estudo da bactéria *Streptomyces* sp. possibilitou o isolamento de uma ditiolpirrolidina cuja estrutura foi estabelecida como 5-oxo-6-(*N*-metilformamida)-4,5-diidro-1,2-ditol[4,3-*b*]pirrol. Esse metabólito teve sua atividade citotóxica testada frente a seis linhagens celulares tumorais, mostrando forte atividade com IC₅₀ de 1,66, 1,05 e 1,52 μM para as linhagens de próstata metastática, carcinoma de ovário e glioblastoma, respectivamente. O estudo de *Kocuria* sp. resultou no isolamento de um novo peptídeo denominado como kocurina. Esse composto teve sua atividade antimicrobiana testada frente a várias bactérias e fungos patogênicos, incluindo cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) e cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a tiazomicina. Kocurina inibiu fortemente o crescimento de MRSA MB5393 com valores de CIM de 0,25 μg/mL, além de exibir atividade antibacteriana contra as bactérias *Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecium*. As estruturas de todos os compostos isolados neste trabalho foram determinadas empregando métodos espectroscópicos tais como RMN ¹H e ¹³C (1D e 2D), espectrometria de massas e infravermelho.

Palavras chave: *Pseudoalteromonas* sp., *Micromonospora* sp., *Streptomyces* sp., *Kocuria* sp., atividade biológica

ABSTRACT

This work describe the chemical and biological investigation of the extracts from the marine bacterias *Pseudoalteromonas* sp., *Micromonospora* sp., *Streptomyces* sp. and *Kocuria* sp., aiming the isolation and structural elucidation of new bioactive constituents. The chemical investigation carried out with the bacteria *Pseudoalteromonas* sp. lead to the isolation a red pigment identified as prodigiosin and two bile acids derivatives known as deoxycholic acid and cholic acid. The prodigiosin was evaluated against four tumor cell lines showing IC₅₀ values similar to the positive control doxorubicin. The chemical study of *Micromonospora* sp. Resulted in the isolation of four new anthracyclinones designed as 4,6,11-trihydroxy-9-propyrltetracene-5,12-dione; 4-methoxy-9-propyrltetracene-6,11-dione; 7,8,9,10 - tetrahydro-9-hydroxy-4-methoxy-9-propiltetra-cene-6,11-dione and 10β-Carbomethoxy-7,8,9,10-tetrahydro-4,6,7α,9α,11-pentahydroxy-9-propyrltetracene-5,12-dione . The cytotoxic potential of these compounds were evaluated against HCT-8cell line, two of which showed moderate cytotoxicity with IC₅₀ values of 12.74 and 6.18 M, respectively. From *Streptomyces* sp. strain was isolated a ditiolpyrrolidin, established as 5-oxo-6-(N-methylformamide) -4,5 - dihydro-1,2-dithiol [4,3-b] pyrrole. This secondary metabolite was tested against six tumor cell lines, shown IC₅₀ values of 1.66, 1.05 and 1.52 mM for the metastatic prostate lines, ovarium carcinoma and glioblastoma, respectively. The study of *Kocuria* sp. lead to the isolation of a new peptide, which was designed as kocurin. This compound was subjected to the tested its antimicrobial assays against several pathogens bacteria and fungal including *Staphylococcus aureus* strains methicillin resistant (MRSA) and *Staphylococcus aureus* strains tiazomicin resistant. Kocurin was strongly active against MRSA MB5393 exhibiting a MIC of 0,25µg/mL, moreover showed antibacterial activity against *Bacillus subtilis* and *Enterococcus faecium*. The structures of all isolated compounds in this work were stabilized employing spectroscopic methods such as ¹H and ¹³C NMR (1D and 2D), mass spectrometry and infrared.

Keywords: *Pseudoalteromonas* sp., *Micromonospora* sp., *Streptomyces* sp., *Kocuria* sp., marine bacteria.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Cepas de espécies de <i>Pseudoalteromonas</i> cultivadas em ágar marino (<i>P. agarivorans</i> - não pigmentada; <i>P. flavipulchra</i> , - amarelo; <i>P. luteoviolacea</i> – roxo escuro e <i>P. rubra</i> – vermelha).	51
Figura 2: Colônias de <i>Micromonospora</i> ssp.	53
Figura 3: Peptídeo antimicrobiano PM181104 isolado do gênero <i>Kocuria</i>	56
Figura 4: Atividade citotóxica dos extratos dos micro-organismos isolados do sedimento marinho da praia da Taíba. Linhagens utilizadas: HL60, SF 295, HCT-8 e MDA-MB-435. Concentração de 50µg/mL usando o o ensaio Alamar após 72 horas de incubação. A doxorrubicina foi usada como padrão positivo.	58
Figura 5: Árvore filogenética que mostra a localização da nova bactéria isolada (negrito) entre diferentes espécies de <i>Pseudoalteromonas</i> . O número de acesso GenBank para cada espécie de referência é mostrado entre parênteses.	59
Figura 6: Cromatograma com os tempos de retenção dos ésteres metílicos identificados	60
Figura 7: Correlações a longa distância observadas no espectro de HMBC de P-1	62
Figura 8: Espectro de massa de alta resolução de P-1	64
Figura 9: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de P-1	64
Figura 10: Espectro de RMN COSY (500 MHz, CDCl ₃) de P-1	65
Figura 11: Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de P-1	65
Figura 12: Espectro de RMN HSQC (125 MHz, CDCl ₃) de P-1	66
Figura 13: Espectro de RMN HMBC (125 MHz, CDCl ₃) de P-1	66
Figura 14: Núcleo comum aos esteroides: ciclopentanoperidrofenantreno	67
Figura 15: Algumas correlações observadas no experimento HMBC para P-2	68
Figura 16: Outras correlações observadas no espectro de HMBC de P-2.....	68
Figura 17: Espectro de massa de alta resolução no modo positivo e negativo de P-2	70
Figura 18: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, C ₅ D ₅ N) de P-2.....	70
Figura 19: Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, C ₅ D ₅ N) de P-2.....	71
Figura 20: Espectro de RMN DEPT 135° (125 MHz, C ₅ D ₅ N) de P-2.....	71
Figura 21: Espectro de RMN HMBC (125 MHz, C ₅ D ₅ N) de P-2.....	72
Figura 22: Expansão do espectro de RMN HMBC (125 MHz, C ₅ D ₅ N) de P-2	72
Figura 23: Correlações observadas no espectro de HMBC de P-3.....	74
Figura 24: Espectro de massa de alta resolução no modo positivo de P-3.....	76
Figura 25: Espectro e RMN ¹ H (500 MHz, C ₅ H ₅ N) de P-3.....	76

Figura 26: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$) de P-3.....	77
Figura 27: Espectro de RMN DEPT 135° (125 MHz, $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$) de P-3.....	77
Figura 28: Espectro de RMN HMBC (125 MHz, $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$) de P-3	78
Figura 29: Prodigiosina aplicada em diferentes tipos de tecidos.....	80
Figura 30: Acoplamento viciniais observados no espectro COSY de M -1.....	82
Figura 31: Acoplamento a longa distância (HMBC) de M -1.....	83
Figura 32: Espectro de absorção na região do infravermelho de M-1.....	85
Figura 33: Espectro de massa de alta resolução do metabólito M-1	85
Figura 34: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de M-1	86
Figura 35: Espectro de RMN COSY (500 MHz, CDCl_3) de M-1	86
Figura 36: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de M-1	87
Figura 37: Espectro de RMN DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) de M-1	87
Figura 38: Espectro de RMN HSQC (125 MHz, CDCl_3) de M-1	88
Figura 39: Espectro de RMN HMBC (125 MHz, CDCl_3) de M-1	88
Figura 40: Acoplamento viciniais observados no espectro COSY de M -2.....	90
Figura 41: Acoplamento a longa distância (HMBC) de M -2.....	91
Figura 42: Espectro de absorção na região do infravermelho de M-2.....	93
Figura 43: Espectro de massa de alta resolução de M-2	93
Figura 44: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de M-2.....	94
Figura 45: Espectro de RMN COSY (500 MHz, CDCl_3) de M-2	94
Figura 46: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de M-2	95
Figura 47: Espectro de RMN DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) de M-2	95
Figura 48: Espectro de RMN HSQC (125 Mhz, CDCl_3) de M-2.....	96
Figura 49: Espectro de RMN HMBC (125 Mhz, CDCl_3) de M-2.....	96
Figura 50: Acoplamentos à longa distância (HMBC) de M -3	98
Figura 51: Espectro de absorção na região do infravermelho de M-3.....	100
Figura 52: Espectro de massa de alta resolução de M-3	100
Figura 53: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de M-3.....	101
Figura 54: Espectro de RMN COSY(125 MHz, CDCl_3) de M-3	101
Figura 55: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de M-3.....	102
Figura 56: Espectro de RMN DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) de M-3.....	102
Figura 57: Espectro de RMN HMBC (125MHz, CDCl_3) de M-3	103
Figura 58: Acoplamentos a longa distância (HMBC) observadas para M -4	105
Figura 59: Espectro de absorção no infravermelho de M-4.....	108

Figura 60: Espectro de massa de alta resolução de M-4	108
Figura 61: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de M-4	109
Figura 62: Espectro de RMN COSY(500 MHz, CDCl_3) de M- 4	109
Figura 63: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de M-4	110
Figura 64: Espectro de RMN HSQC (125 MHz, CDCl_3) de M-4	110
Figura 65: Espectro de RMN HMBC (125 MHz, CDCl_3) de M-4	111
Figura 66: Espectro de RMN NOESY (125 MHz, CDCl_3) de M-4	111
Figura 67: Metabólitos M-1 e M-4 e o padrão doxorrubicina	112
Figura 68: Metabólitos M-2 e M-3 isolados de <i>Micromonospora</i> sp.....	113
Figura 69: Curva de crescimento de <i>Streptomyces</i> sp. (linha contínua) em g/L versus atividade citotóxica do extrato bruto (linha pontilhada) através dos valores de IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$) em células HCT-8 com 72 horas de incubação.	114
Figura 70: Importantes correlações observadas nos experimentos de HMBC ^1H - ^{13}C (preto) e ^1H - ^{15}N (azul).....	116
Figura 71: Espectro de absorção na região do infravermelho de S-1	117
Figura 72: Espectro de massa de alta resolução no modo positivo e negativo de S-1	118
Figura 73: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$) de S-1	118
Figura 74: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$) de S-1	119
Figura 75: Espectro de RMN HSQC (125 MHz, $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$) de S-1	119
Figura 76: Espectro de RMN HMBC ^1H - ^{13}C (125 MHz, $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$) de S-1.....	120
Figura 77: Espectro de RMN HMBC ^1H - ^{13}N (50 MHz, $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$) de S-1	120
Figura 78: Comparação entre a tiolutina e do metabólito S-1	122
Figura 79: Correlações exibidas nos experimentos HMBC e TOCSY para K-1.....	125
Figura 80: Principais correlações exibidas no experimento HMBC e fragmentos fornecidos pelo espectro de massa para Kocurina	126
Figura 81: Reação de derivatização dos aminoácidos (L) ou (D) com reagente de Marfey (L)	127
Figura 82: Aminoácidos obtidos após reações de hidrólise e ozonólise de kocurina.....	127
Figura 83: Cromatograma de kocurina hidrolisado e derivatizado.....	128
Figura 84: Cromatograma de kocurina após reação de ozonólise seguida de hidrólise e derivatização com reagente de Marfey's	129
Figura 85: Dopagem do aminoácido cisteína com L-Cya e D-Cya.....	130
Figura 86: Estruturas de kocurina, do antibiótico GE 37468 A e do peptídeo antibacteriano PM181104.....	131

Figura 87: Espectro MS/MS de Kocurina	132
Figura 88: Espectro de absorção na região do infravermelho de K-1	134
Figura 89: Espectro de massa de alta resolução de K-1	134
Figura 90: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de K1	135
Figura 91: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de K1	135
Figura 92: Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de K1	136
Figura 93: Espectro de RMN HSQC (125 MHz, CDCl ₃) de K1	136
Figura 94: Espectro de RMN HMBC (125 MHz, CDCl ₃) de K1	137
Figura 95: Espectro de RMN HMBC (125 MHz, CDCl ₃) de K1	137
Figura 96: Espectro de RMN COSY (500 MHz, CDCl ₃) de K1	138
Figura 97: Espectro de RMN TOCSY (500 MHz, CDCl ₃) de K1	138
Figura 98: <i>Eudistoma vannamei</i>	144
Figura 99: Placa da bactéria <i>Pseudoalteromonas</i> sp.	145
Figura 100: Fracionamento do extrato bruto de <i>Pseudoalteromonas</i> sp (a) e cromatoplaça de isolamento do metabólito P-1 (b)	146
Figura 101: Placa de cultivo de <i>Micromonospora</i> sp.	147
Figura 102: Obtenção dos fermentados de <i>Micromonospora</i> sp.	147
Figura 103: Placa de cultivo da bactéria <i>Streptomyces</i> sp.	149
Figura 104: Cromatograma de isolamento do metabólito S-1	151
Figura 105: Perfil cromatográfico do extrato metanólico de <i>Kocuria</i> sp. em Combi Flash .	152
Figura 106: Perfil cromatográfico da Fração F8	152

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Número de compostos isolados a partir de espécies de bactérias marinhas nos últimos dez anos	16
Gráfico 2: Gêneros de bactérias de origem marinha mais estudados nos últimos dez anos ...	17
Gráfico 3: Número de espécies e compostos isolados do gênero <i>Streptomyces</i> nos período de 2003 a 2012	18
Gráfico 4: Número de espécies e de compostos isolados pertencentes aos gêneros mais estudados.....	19
Gráfico 5: Principais classes de compostos estudadas na última década	20
Gráfico 6: Distribuição dos peptídeos isolados no período de 2003 a 2012 a partir de bactérias marinhas	21
Gráfico 7: Divisão da classe dos terpenóides	22
Gráfico 8: Principais atividades relatadas para os compostos isolados de bactérias marinhas no período de 2003 a 2012.....	23

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Metabólitos bioativos isolados de espécies de <i>Pseudoalteromonas</i>	52
Quadro 2: Metabólitos secundários isolados de <i>Micromonospora</i> sp. de origem marinha	54
Quadro 3: Compostos bioativos isolados a partir de cepas de <i>Streptomyces</i> marinhas	55

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1: Fracionamento cromatográfico de <i>Micromonospora</i> sp.....	148
--	-----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados reunidos no levantamento para compostos obtidos de bactérias marinhas no período de 2003 a 2012.....	24
Tabela 2: Ácidos graxos identificados no extrato de <i>Pseudoalteromonas</i> sp.	60
Tabela 3: Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e ¹³ C de P-1. Dados de RMN ¹³ C da prodigiosina (VALENTE et al., 2008).....	63
Tabela 4: Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e ¹³ C de P-2 e comparação com a literatura (LI et al., 2009).....	69

Tabela 5: Dados espectrais de P-3 e comparação com ácido cólico (MANEERAt et al, 2004)	75
Tabela 6: Citotoxicidade de <i>Pseudoalteromonas</i> sp. (extrato bruto, fração F3 e prodigiosina).	79
Tabela 7: Dados de RMN ^1H e ^{13}C (CDCl_3) de M-1	84
Tabela 8: Dados de RMN ^1H e ^{13}C (CDCl_3) de M-2	92
Tabela 9: Dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C (CDCl_3) de M-3.....	99
Tabela 10: Dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C do metabólito M-4 e da ϵ -Rhodomycinone (JOHDO et al., 1991).	107
Tabela 11: Citotoxicidade das antraciclínicas M-1 a M-4	112
Tabela 12: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C dos metabólitos S-1a e S-1b em $\text{C}_5\text{H}_5\text{N-d}_5$	117
Tabela 13: Linhagens celulares tumorais utilizadas nos ensaios de citotoxicidade in vitro	121
Tabela 14: IC_{50} da ditiolpirrolidina isolada a partir do extrato de <i>Streptomyces</i> sp. avaliada em linhagens tumorais pelo teste de MTT. Os resultados apresentados como valores de IC_{50} tem intervalo de confiança de 95% de confiança determinados por regressão não linear pelo programa GraphPad Prism 5.0.	121
Tabela 15: Tempos de retenção observados para os aminoácidos livres de kocurina e dos padrões utilizados na análise de Marfey's	129
Tabela 16: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, CDCl_3) para Kocurina	133
Tabela 17: Dados resultantes do fracionamento cromatográfico da fração F-2.....	148

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	<i>Distribuição dos gêneros</i>	17
2.2	<i>Metabólitos isolados de bactérias marinhas</i>	19
2.3	<i>Atividades biológicas relatadas</i>	23
3.0	CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE AS BACTÉRIAS MARINHAS ESTUDADAS	51
3.1	<i>Pseudoalteromonas sp.</i>	51
3.2	<i>Micromonospora sp.</i>	53
3.3	<i>Streptomyces sp.</i>	55
3.4	<i>Kocuria sp.</i>	56
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1	<i>Pseudoalteromonas sp.</i>	57
4.1.1	<i>Identificação dos ésteres metílicos</i>	60
4.1.2	<i>Determinação estrutural de P-1</i>	61
4.1.3	<i>Determinação estrutural de P-2</i>	67
4.1.4	<i>Determinação estrutural de P-3</i>	73
4.1.5	<i>Atividade Biológica</i>	79
4.2	<i>Micromonospora sp.</i>	81
4.2.1	<i>Determinação Estrutural de M-1</i>	81
4.2.2	<i>Determinação Estrutural de M-2</i>	89
4.2.3	<i>Determinação Estrutural de M-3</i>	97
4.2.4	<i>Determinação Estrutural de M-4</i>	104
4.2.5	<i>Atividade Biológica</i>	112
4.3	<i>Streptomyces sp.</i>	114
4.3.1	<i>Curva de crescimento cinético de Streptomyces sp.</i>	114
4.3.2	<i>Determinação estrutural de S-1</i>	115
4.3.3	<i>Atividade Biológica</i>	121
4.4	<i>Kocuria sp.</i>	123
4.4.1	<i>Determinação estrutural de K-1</i>	123
4.4.2	<i>Atividade Biológica</i>	139

5	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	141
5.1	Métodos Cromatográficos.....	141
5.1.1	<i>Cromatografia de adsorção</i>	141
5.1.2	<i>Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)</i>	141
5.2	Métodos Físicos.....	142
5.2.1	<i>Ponto de fusão</i>	142
5.2.2	<i>Rotação óptica</i>	142
5.3	Métodos Espectrométricos.....	142
5.3.1	<i>Espectroscopia na região de absorção do infravermelho (IV)</i>	142
5.3.2	<i>Espectrometria de massas (EM)</i>	142
5.3.3	<i>Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)</i>	143
5.4	Estudos dos Micro-organismos.....	144
5.4.1	<i>Pseudoalteromonas sp.</i>	144
5.4.2	<i>Micromonospora sp.</i>	147
5.4.3	<i>Streptomyces sp.</i>	149
5.4.4	<i>Kocuria sp</i>	151
5.4.4.1	<i>Análise de Marfey's</i>	153
5.5	Atividades Biológicas.....	154
5.5.1	<i>Ensaio de Atividade Citotóxica em células tumorais in vitro – MTT</i>	154
5.5.2	<i>Ensaio Antifúngico</i>	154
5.5.3	<i>Ensaio Antibacteriano</i>	155
6	CONCLUSÕES	157
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	159

1. INTRODUÇÃO

Metabólitos secundários são definidos como compostos orgânicos sintetizados pelos organismos vivos que não são essenciais no crescimento e na reprodução dos mesmos. Esses metabólitos caracterizam-se pela grande diversidade de estrutura química e variação de forma em diferentes condições ambientais e conferindo vantagem seletiva ao organismo produtor (TAVARES, 1999; PELÁEZ, 2006; BUTTER & BUSS, 2006; KELLER *et al.*, 2005).

Embora os micro-organismos sejam, na maioria dos casos, associados a aspectos negativos, principalmente à saúde humana, os fungos e as bactérias tem se mostrado como fontes promissoras na produção de metabólitos secundários bioativos. Acredita-se que a produção desses metabólitos por micro-organismos desempenhe diversas funções no meio ambiente, como comunicação e proteção, assegurando a sua sobrevivência em condições de estresse ambiental (OVERBYE & BARRET, 2005).

Os estudos com micro-organismos são considerados estratégicos por envolver o conhecimento da biodiversidade num sentido amplo, além de fontes renováveis de substâncias com importância biomédica. Vale ressaltar que o isolamento, cultivo e identificação de micro-organismos depende de amostras muito pequenas, causando pouco ou nenhum impacto às populações, ao contrário do que pode ocorrer quando se pretende trabalhar com macro-organismos, que não podem ser facilmente cultivados e precisam ser coletados em grandes quantidades para o trabalho de isolamento dos compostos, identificação estrutural e bioensaios.

Nos últimos 60 anos, cerca de 30.000 a 50.000 produtos naturais foram descobertos a partir de micro-organismos, dos quais mais de 10.000 são biologicamente ativos, sendo mais de 8.000 antitumorais e antibióticos (FENICAL, 1993; FENICAL & JENSEN, 1993). Atualmente, cerca de 120, entre os mais importantes medicamentos utilizados são derivados de micro-organismos (JENSEN & FENICAL, 2000). É, portanto, indiscutível a importância dos micro-organismos como fonte elaboradora de substâncias bioativas.

Neste trabalho descreve-se o estudo químico e biológico dos extratos de quatro bactérias marinhas: *Micromonospora* sp., *Pseudoalteromonas* sp., *Streptomyces* sp. e *Kocuria* sp., concentrando-se no isolamento, caracterização e avaliação farmacológica dos seus metabólitos secundários.

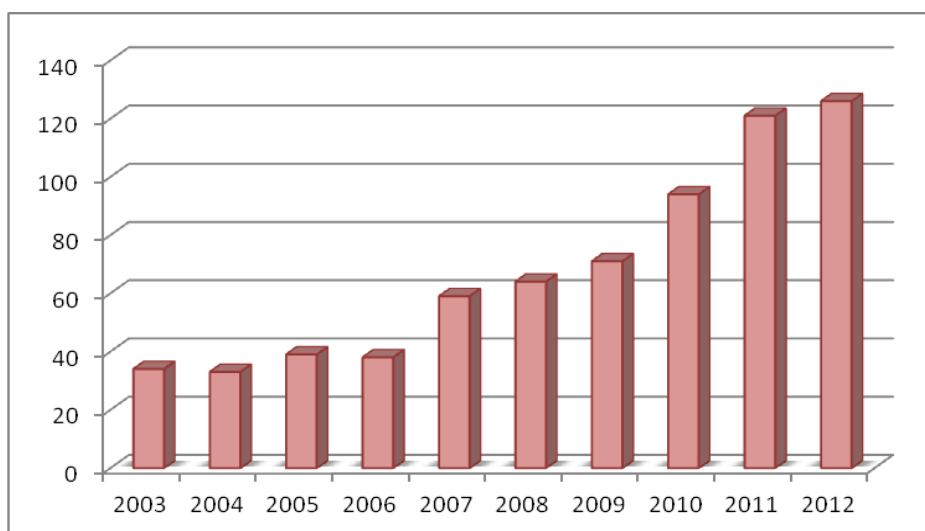
O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análise Fitoquímica de Plantas Medicinais (LAFIPLAM II) do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará em parceria com o Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) e com a Fundación Centro de Exelencia en Investigación de Medicamentos Innovadores en Andalucía (Fundación Medina), na Espanha.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo de revisão bibliográfica foi realizada uma análise quantitativa para os novos produtos naturais, obtidos de bactérias marinhas, relatados no período de 2003 a 2012. Os dados apresentados neste levantamento foram obtidos principalmente dos trabalhos de revisões anuais de Blunt e colaboradores para os anos de 2003 a 2011. Essas revisões incluem todos os novos produtos naturais marinhos isolados por ano, bem como informações farmacológicas, biológicas e químicas dos compostos isolados no período. Para o ano de 2012, as informações foram obtidas a partir do banco de dados “Scifinder”, sendo a pesquisa refinada com o termo “marine bacteria”. Todos os dados obtidos foram reunidos na Tabela 1 (p. 24), incluindo os nomes e a classe dos compostos isolados, as espécies estudadas e as atividades biológicas relatadas. Esperamos que essa revisão forneça uma visão abrangente sobre a evolução das pesquisas de produtos naturais obtidos de bactérias marinhas.

Com base nas informações reunidas na Tabela 1, foi possível construir o Gráfico 1, o qual exibe o número de novos compostos isolados a partir de bactérias marinhas nos últimos dez anos. Observa-se que nos primeiros quatro anos, 2003 a 2006, foram descobertos menos de 40 novos compostos anualmente, no entanto, a partir de 2007, observou-se um crescimento constante na obtenção de compostos dessa origem chegando, a 126 novos metabólitos no ano de 2012. Ao todo, nos últimos dez anos, foram isolados 668 substâncias, sendo 36,7% desses compostos isolados nos dois últimos anos (2011-2012), o que mostra o recente interesse na obtenção de produtos naturais a partir de bactérias marinhas e também devido aos avanços.

Gráfico 1: Número de compostos isolados a partir de espécies de bactérias marinhas nos últimos dez anos

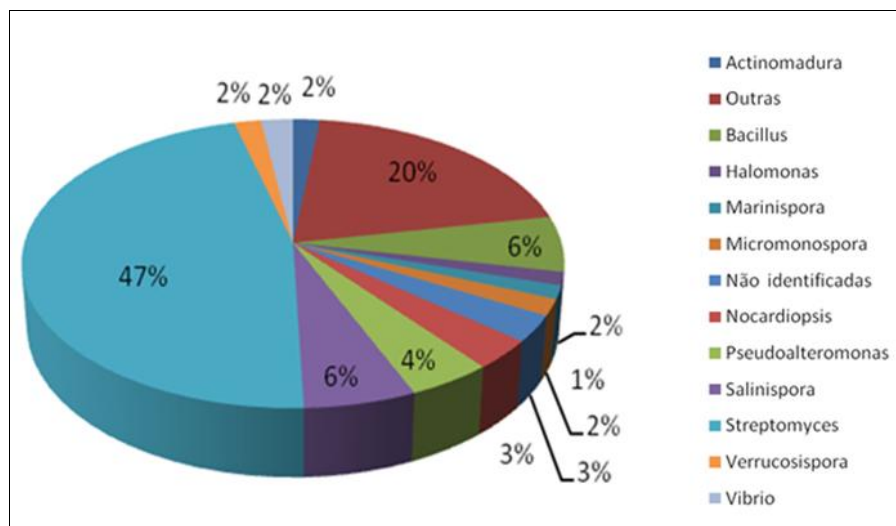


2.1 Distribuição dos gêneros

Os micro-organismos marinhos estão presentes em quase todos os tipos de habitats, desde águas congeladas de regiões polares, mangues, praias, águas profundas, limpas ou poluídas, até águas escaldantes de fontes termais. Estima-se que a abundância microbiológica marinha é cerca de 10^6 bactérias/mL de água do mar, sendo que esse número sobe para 10^9 bactérias/mL quando consideramos sedimentos do fundo oceânico. Em ecossistemas como esses, ou em recifes de corais, por exemplo, a diversidade microbiológica marinha pode chegar a ser maior do que a das florestas tropicais (FENICAL & JENSEN, 2006; LAM, 2006). As espécies relatadas nessa revisão foram obtidas, em sua maioria, de sedimentos marinhos obtidos de vários lugares do mundo. Também foram estudadas bactérias associadas a esponjas marinhas, peixes e moluscos e também associadas a plantas de mangues.

De acordo com as nossas estatísticas, na última década foram relatados 50 diferentes gêneros, compreendendo 281 espécies de bactérias estudadas. O Gráfico 2 mostra os gêneros mais estudados no período de 2003 a 2012. Importante destacar que os gêneros os quais incluíram no máximo três espécies, foram reunidos e chamados de outros.

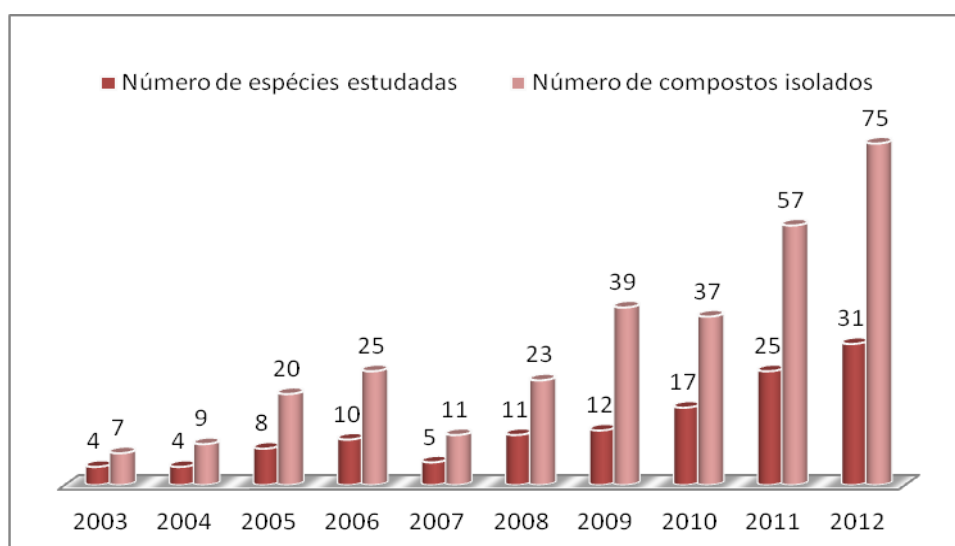
Gráfico 2: Gêneros de bactérias de origem marinha mais estudados nos últimos dez anos



Conforme apresentado no Gráfico 2, o gênero *Streptomyces* foi o mais investigado, sendo responsável por 47% (127) das espécies estudadas. Esse resultado era esperado, uma vez que entre as actinobactérias, o gênero *Streptomyces* é o maior representante, incluindo mais de 500 espécies. Atualmente é o gênero que mais contribui com a farmacêutica, sendo responsável pela produção de mais de 80% dos antibióticos conhecidos, assim como dos antitumorais, anti-helmínticos ou antiparasitários (ANDRÉS, 2011). O Gráfico 3 (p. 18),

mostra o número de espécies do gênero *Streptomyces* investigadas, bem como o número de novos compostos isolados no intervalo de 2003 até 2012. Observa-se que no ano de 2003, apenas 4 espécies do gênero *Streptomyces* de origem marinha foram estudadas, resultando no isolamento de 7 metabólitos. Por outro lado, em 2012, foram investigadas 31 bactérias desse gênero, resultando na obtenção de 75 novos compostos. Esses resultados comprovam a importância e o crescente interesse nesse gênero, provavelmente, devido a maioria das cepas de *Streptomyces* sintetizarem substâncias com propriedades antibacterianas, antifúngicas, antitumorais, antiparasitárias e herbicidas e ainda muitas das quais têm sido empregadas na medicina e agricultura, bem como em vários processos biotecnológicos (MUTH et al., 1999). Nos últimos dez anos foram isolados 303 compostos desse gênero, a partir de bactérias marinhas, correspondendo a 45,3% de todos os compostos isolados no período da revisão.

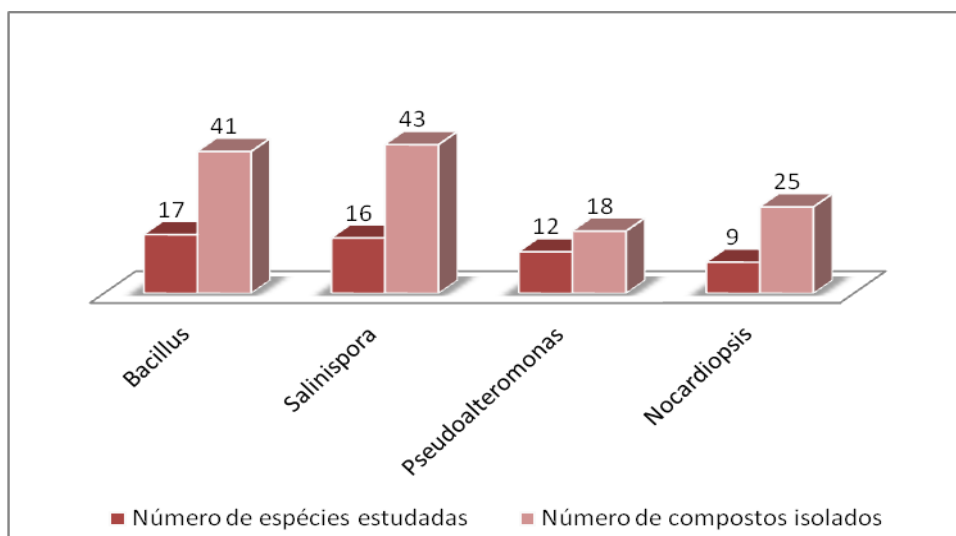
Gráfico 3: Número de espécies e compostos isolados do gênero *Streptomyces* nos período de 2003 a 2012



Em seguida, os gêneros mais estudados foram *Bacillus*, *Salinispora*, *Pseudoalteromonas* e *Nocardiopsis*, representando 8, 6, 4 e 3% , respectivamente, das bactérias estudadas. No Gráfico 4 (p.19), são mostrados o número de espécies e de compostos isolados desses gêneros na última década. Observa-se que o gênero *Bacillus* foi o segundo mais estudado com 17 espécies e 41 compostos isolados. Contudo, o maior produtor de metabólitos secundários foi o gênero *Salinispora* o qual produziu 43 novos compostos. O mesmo é observado quando se compara os gêneros *Nocardiopsis* e *Pseudoalteromonas*, onde

observou-se a maior produção de metabólitos no gênero *Pseudoalteromonas*, apesar do menor número de espécies estudadas.

Gráfico 4: Número de espécies e de compostos isolados pertencentes aos gêneros mais estudados



2.2 Metabólitos isolados de bactérias marinhas

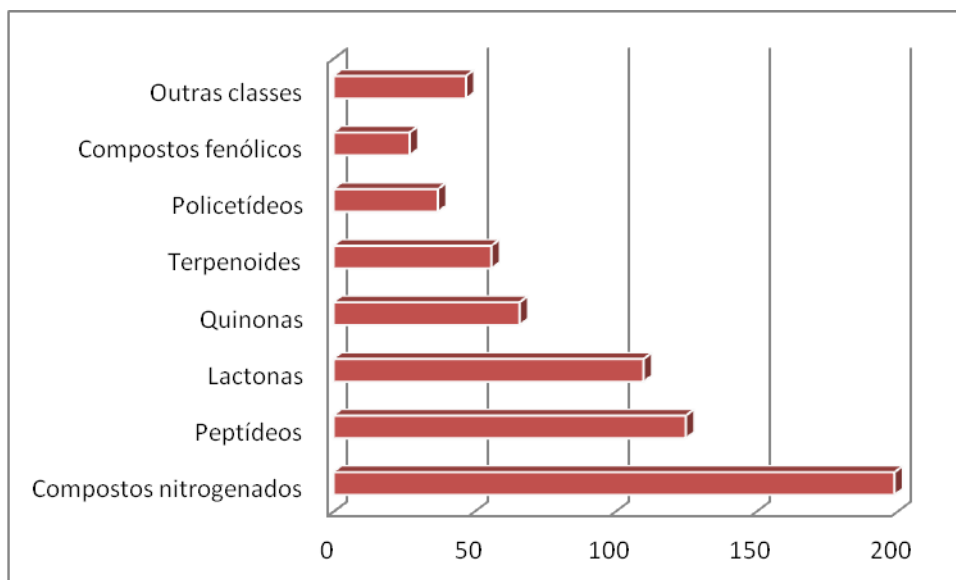
As bactérias produzem substâncias que podem ser importantes na comunicação, defesa, inibição de competidores, reprodução, ou simplesmente como subproduto do seu metabolismo. Essas substâncias pertencem a várias classes de compostos e podem apresentar atividades biológicas diversas, podendo ser úteis no desenvolvimento e/ou planejamento de novos medicamentos contra as mais diversas enfermidades (DONIA e HAMANN, 2003).

De acordo com os dados levantados, a maioria dos compostos podem ser distribuídos em sete classes principais, são elas: compostos nitrogenados (incluindo os alcaloides), peptídeos, lactonas, quinonas, terpenóides, policetídeos e compostos fenólicos. Os compostos pertencentes as classes minoritárias tais como, ácidos carboxílicos, cetonas, esteroides, éteres, entre outros, foram somados e classificados como outras classes.

O Gráfico 5 (p. 20), mostra a distribuição dos 668 novos compostos, isolados no período de 2003 a 2012, nas classes acima mencionadas. De acordo com este gráfico, as classes que mais tiveram compostos isolados foram as dos compostos nitrogenados, peptídeos e lactonas, que juntos representaram 64,9% dos metabólitos isolados. Os compostos fenólicos foi a classe com menos representantes, tendo sido isolados apenas 27 compostos. No entanto, vale ressaltar que muitos dos compostos classificados nas classes acima citadas também

poderiam ser incluídos na classe dos compostos fenólicos, visto que apresentaram grupos hidroxilas ligados a anel aromático.

Gráfico 5: Principais classes de compostos estudadas na última década

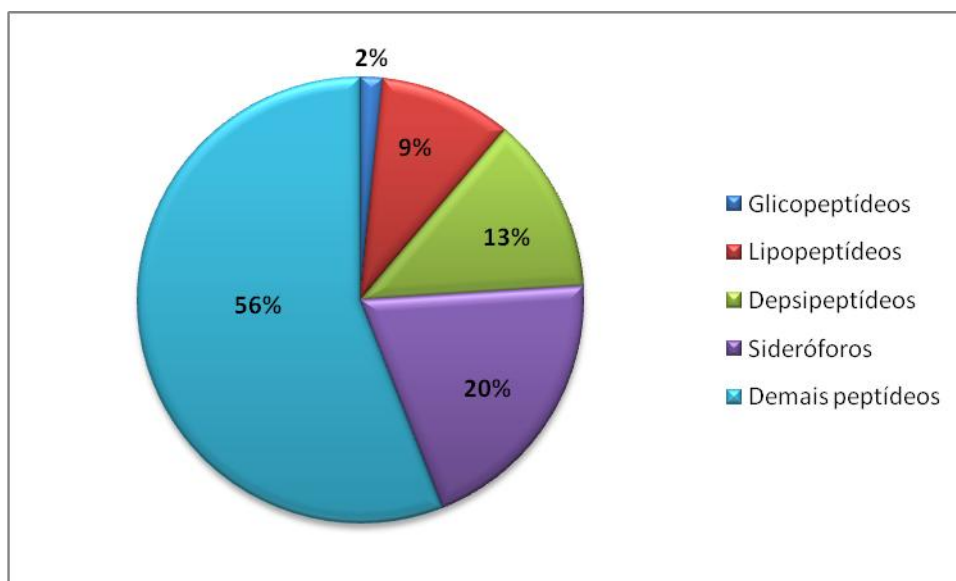


Na classe dos compostos nitrogenados foram incluídos 199 metabólitos, entre eles 147 alcaloides, além de amidas, macrolactamas e outros compostos contendo nitrogênio. Entre os alcaloides aqueles contendo núcleos piridínicos, dicetopiperazínicos e fenazínicos foram os mais representativos.

Os peptídeos constituem a segunda classe mais isolada, onde foram incluídos 125 metabólitos, entre eles: depsipeptídeos, lipopeptídeos, glicopeptídeos e sideróforos. O gráfico 6 (p.21) mostra a distribuição dos peptídeos isolados no período de 2003 a 2012.

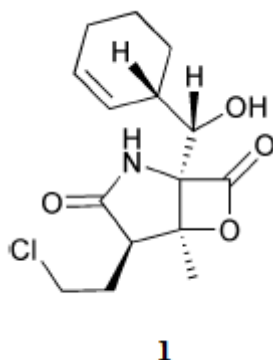
Os sideróforos, os quais são responsáveis por 20% dos peptídeos registrados, são de síntese não-ribossômica e são produzidos e secretados por micro-organismos sob estresse de ferro (KADI & CHALLIS, 2009).

Foram isolados 16 depsipeptídeos, que são peptídeos modificados contendo um ou mais grupos ésteres; 12 lipopeptídeos, os quais possuem uma cadeia lateral de ácido graxo, e somente 2 glicopeptídeos, que são aqueles que possuem uma ou mais unidades de açúcar. Os peptídeos que não se incluíam em nenhuma destas classificações foram incluídos em demais peptídeos e representaram 56 % dos metabólitos peptídicos isolados.

Gráfico 6: Distribuição dos peptídeos isolados no período de 2003 a 2012 a partir de bactérias marinhas

As lactonas representaram 16,4% dos metabólitos isolados. Nesta classe foram incluídos macrolídeos, pironas, caprolactonas e cumarinas. Os macrolídeos foram os maiores representantes dessa classe, com 43 metabólitos isolados.

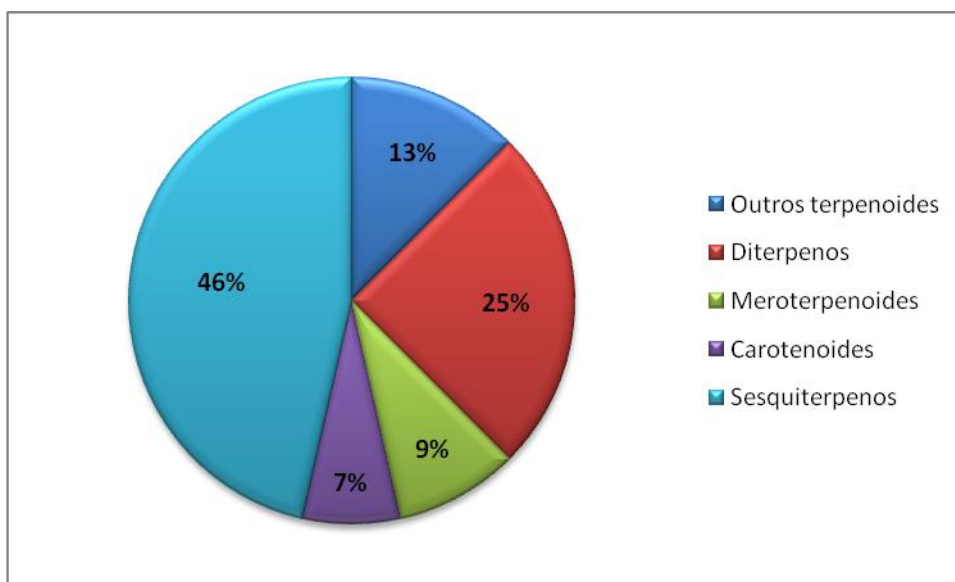
Entre as lactonas, destaca-se um dos mais importantes compostos isolados de bactéria marinha, a salinosporamida A (**1**). Essa β -lactona, isolada a partir de uma cultura de *Salinospora tropica* proveniente de uma amostra de sedimento marinho das Bahamas, exibiu potente e seletiva citotoxicidade *in vitro* contra várias linhagens celulares do Instituto Nacional do Câncer (FELING *et al.*, 2003). Atualmente este composto está na fase I de testes clínicos, realizados pela Nereus Pharmaceuticals em San Diego, no tratamento de vários tipos de câncer, incluindo a linhagem celular de mieloma múltiplo, um câncer das células plasmáticas da medula óssea. A salinosporamida A foi um dos compostos que passaram mais rapidamente pelas fases de pesquisa e de testes, com a sua descoberta e elucidação estrutural, em 2003, e o ingresso na fase I de testes clínicos, em 2007 (ABAYOMI *et al.*, 2007; MALDONATO, 2007; FENICAL *et al.* 2008; ANDE *et al.*, 2009).



As quinonas também se encontram entre os metabólitos mais isolados, totalizando 66 compostos, incluindo antraquinonas, hidroquinonas e ubiquinonas. As antraquinonas representaram 72,7 % dessa grande classe.

Outra classe de destaque foram os terpenoides, contabilizando 56 compostos, classificados em sesquiterpenos, diterpenos, meroterpenóides (compostos de origem mista contendo uma parte policetídica e outra terpenoídica), carotenoides e em outros terpenoides (Gráfico 7). Os sesquiterpenos foram os metabólitos mais isolados sendo responsáveis por 46% desta classe, seguido dos diterpenos com 25%.

Gráfico 7: Divisão da classe dos terpenóides

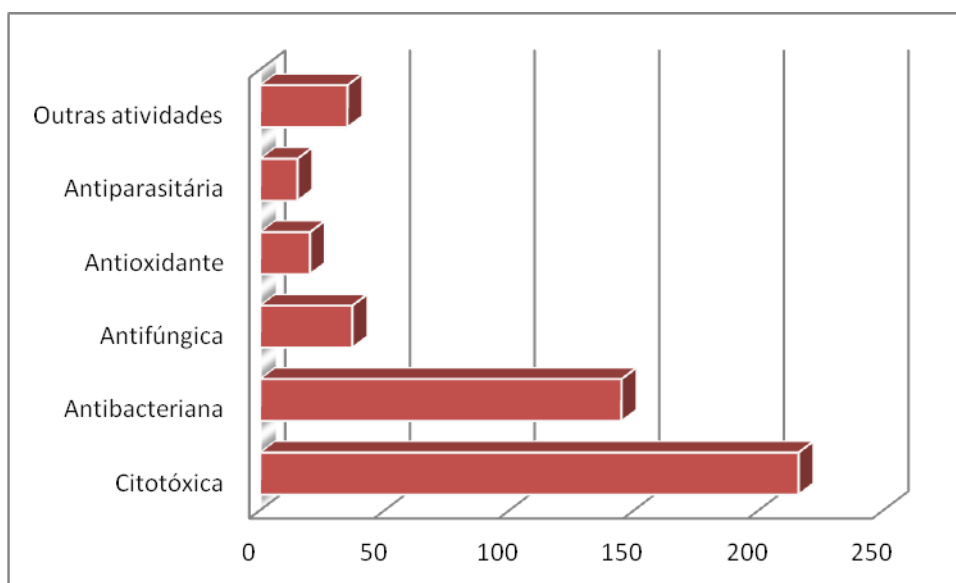


Nas classes dos policetídeos e dos compostos fenólicos foram incluídos 37 e 27 compostos, respectivamente.

2.3 Atividades biológicas relacionadas

A maioria dos metabólitos isolados no período de 2003 a 2012 foram avaliados quanto as suas atividades biológicas. No Gráfico 8, estão apresentados as principais atividades registradas para os compostos obtidos no período citado.

Gráfico 8: Principais atividades relatadas para os compostos isolados de bactérias marinhas no período de 2003 a 2012



As atividades antibacteriana e citotóxica foram as mais investigadas, representando 77,1% de todos os compostos ativos, sendo 217 compostos com atividade citotóxica e 145 com atividade antibacteriana. Em outras atividades estão incluídas as demais atividades observadas, como: antiviral, inibição da enzima acetilcolinesterase, antiinflamatória, inibição de microalgas, antidiabética, imunossupressiva, entre outras.

Também foi observado que entre os compostos peptídicos predominou a investigação da atividade antimicrobiana (antibacteriana e antifúngica), enquanto que, entre os compostos nitrogenados, a atividade mais observada foi a citotóxica.

Tabela 1: Levantamento dos compostos obtidos de bactérias marinhas no período de 2003 a 2012

Compostos	Classe	Espécies	Atividade	Referência
1(10-aminodecil)piridinium	Alcaloide	<i>Amycolatopsis alba</i>	Citotóxica e Antibacteriana	DASARI <i>et al.</i> , 2012
1,4-dimetoxi-3-(3R*-hydroxi-3R*-metil-1-tetralona)-1(3H)-isobenzofurano	Antraquinona	<i>Streptomyces</i> sp.	Citotóxica	XIE <i>et al.</i> , 2012
Amonificina C Amonificina D	Cromenos	<i>Thermovibrio ammonifican</i>	Citotóxica	ANDRIANASOLO <i>et al.</i> , 2012
Antimicina B1 Antimicina B2	Compostos nitrogenados	<i>Streptomyces lusitanus</i>	Antibacteriana	HAN <i>et al.</i> , 2012
Bahamaolida A Bahamaolida B	Macrolídeos	<i>Streptomyces</i> sp.	Antifúngica (Bahamaolida A)	KIM <i>et al.</i> , 2012
Ciclodisidina A Ciclodisidina B Ciclodisidina C Ciclodisidina D	Lipopeptídeos	<i>Streptomyces</i> sp.	-	ABDELMOHSEN <i>et al.</i> , 2012
Cromomicina B	Policetídeos	<i>Streptomyces coelicolor</i>	Citotóxica	LU, Y <i>et al.</i> , 2012
Estrepnonesida A Estrepnonesida A	Antraquinonas	<i>Streptomyces</i> sp.	-	LU, J <i>et al.</i> , 2012
Galvaquinona A Galvaquinona B Galvaquinona C 5,8-diidroxi-2,2,4-trimetil-6-(3-metilbutil)-antra[9,1- <i>de</i>][1,3]oxazin-7(2H)-ona	Antraquinonas	<i>Streptomyces spinoverrucosus</i>	Citotóxica (Galvaquinona B)	HU <i>et al.</i> , 2012
Geranilfenazinediol	Fenazina	<i>Streptomyces</i> sp.	Inibição da enzima acetilcolinesterase	OHLENDORF <i>et al.</i> , 2012
Halichoblelida B Halichoblelida C	Macrolídeos	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Citotóxica	YAMADA <i>et al.</i> , 2012

kailuina F	Depsipeptideo	<i>Vibrio</i> sp.	Antimicroalga	RAJU <i>et al.</i> , 2012
N-(2-hidroxifenil)-2-fenazinamina	Fenazina	<i>Nocardia dassonvillei</i>	Antifúngica e Citotóxica	GAO <i>et al.</i> , 2012
Neomaclafungina A Neomaclafungina B Neomaclafungina C Neomaclafungina D Neomaclafungina E Neomaclafungina F Neomaclafungina G Neomaclafungina H Neomaclafungina I	Macrolídeos	<i>Actinoalloteichus</i> sp.	Antifúngica	SATO <i>et al.</i> , 2012
Peptidolipina B Peptidolipina C Peptidolipina D Peptidolipina E Peptidolipina F	Lipopeptídeos	<i>Nocardia</i> sp.	Antibacteriana (Peptidolipinas B e E)	WYCHE <i>et al.</i> , 2012
Pseudoalteromona A	Ubiquinona	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	Citotóxica	CHEN <i>et al.</i> , 2012
Totopotensamida A Totopotensamida B	Peptídeos	<i>Streptomyces</i> sp.	-	LIN <i>et al.</i> , 2012
O-específico-polissacarídeo	Polissacarídeo	<i>Oceanisphaera litoralis</i>	-	KOMANDROVA <i>et al.</i> , 2012
Urdamicinona E Urdamicinona G Dehidroiaquaamicina	Antraquinonas	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacteriana Antiparasitária	SUPONG <i>et al.</i> , 2012
Helicascolida C	Lactona	<i>Daldinia eschscholzii</i>	Antifúngica	TARMAN <i>et al.</i> , 2012
Nigribactin	Siderofóro	<i>Vibrio nigripulchritudo</i>	Antibacteriana	NIELSEN <i>et al.</i> , 2012
Mojavensina A	Lipopeptídeo	<i>Bacillus mojavensis</i>	Citotóxica Antifúngica Antibacteriana	MA <i>et al.</i> , 2012
Piramidamicina A	Benzamidas	<i>Streptomyces</i> sp.		SHAABAN <i>et al.</i> , 2012

Piramidamicina B Piramidamicina C Piramidamicina D 3-hidroxiquinolina-2-carboxamida	(A-D) Carboxamida (3-hidroxiquinolina-2-carboxamida)		Citotóxica	
<i>Gilvocarcina HE</i>	Policetídeo	<i>Streptomyces</i> sp.	Citotóxica Antifúngica Antibacteriana	HOU <i>et al.</i> , 2012
Martiapeptide A	Ciclopeptídeo	<i>Marinactinospora thermotolerans</i>	Citotóxica Antibacteriana	ZHOU <i>et al.</i> , 2012
4,6,11-trihidroxi-9-propiltetraceno-5,12-diona (M-1) 4-metoxi-9-propiltetraceno-6,11-diona (M-2) 7,8,9,10-tetrahidro-9-hidroxi-4-metoxi-9-propiltetra-ceno-6,11-diona (M-3) 10 β -metoxicarbonil-7,8,9,10-tetrahidro-4,6,7 α ,9 α ,11-pentahidroxi-9-propil-tetraceno-5,12-diona (M-4)	Antraquinonas	<i>Micromonosora</i> sp.	Citotóxica (M-1 e M-4)	SOUSA <i>et al.</i> , 2012
Ieodoglucomida A Ieodoglucomida B	Glicopeptídeos	<i>Bacillus licheniformis</i>	Citotóxica (Ieodoglucomida B) Antifúngica Antibacteriana	TAREQ <i>et al.</i> , 2012
Estreptocarbazol A Estreptocarbazol B	Alcaloides	<i>Streptomyces</i> sp.	Citotóxica (Estreptocarbazol A)	FU <i>et al.</i> , 2012
Fradcarbazol A Fradcarbazol B Fradcarbazol C	Alcaloides	<i>Streptomyces fradiae</i>	Citotóxica	FU <i>et al.</i> , 2012
Amosamida D	Alcaloide	<i>Streptomyces variabilis</i>	Citotóxica	PAN <i>et al.</i> , 2012
Espiroindimicina A	Alcaloides	<i>Streptomyces</i> sp.	Citotóxica	ZHANG <i>et al.</i> , 2012

Espiroindimicina B Espiroindimicina C Espiroindimicina D			(Espiroindimicinas B e C)	
Ácido eritrólico A Ácido eritrólico B Ácido eritrólico C Ácido eritrólico D Ácido eritrólico E	Diterpenos	<i>Erythrobacter</i> sp.	Citotóxica	HU, Y <i>et al.</i> , 2012
L-O-Lac-L-Val-D-O-Hiv-D-Val	Peptídeo	<i>Streptomyces bacillaris</i>	-	HU e MACMILLAN <i>et al.</i> , 2012
2-hidroxi-5-(3-metilbut-2-enil) benzaldeído	Compostos fenólicos	<i>Streptomyces atrovirens</i>	Antibacteriana	CHO e KIM., 2012
Persipeptídeo A Persipeptídeo B	Peptídeo	<i>Streptomyces</i> sp.	-	MOHAMMADIPANAH <i>et al.</i> , 2012
Heronamicina A	Alcaloide	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacteriana	RAJU, R <i>et al.</i> , 2012
Meroclorina A Meroclorina B Meroclorina C Meroclorina D	Meroterpenóides	<i>Streptomyces coelicolor</i>	Antibacteriana	KAYSSER <i>et al.</i> , 2012
Nocazina D Nocazina E	Dicetopiperazinas	<i>Nocardiopsis alba</i>	-	ZHANG, Q <i>et al.</i> , 2012
Estreptosetina A	Composto nitrogenado	Não identificada	Citotóxica	AMAGATA <i>et al.</i> , 2012
JBIR-78 JBIR-95	Peptídeos	<i>Kibdelosporangium</i> sp.	Antibacteriana (JBIR-78)	IZUMIKAWA , TAKAGI E SHIN-YA, 2012
JBIR-109 JBIR-110 JBIR-111	Compostos nitrogenados	<i>Streptomyces</i> sp.	Citotóxica	HOSOYA <i>et al.</i> , 2012
Lucentamicina E	Peptídeo	<i>Nocardiopsis lucentensis</i>	-	CHA <i>et al.</i> , 2012
Grincamicina B	Benzatraquinonas	<i>Streptomyces lusitanus</i>	Citotóxica	HUANG <i>et al.</i> , 2012

Grincamicina C Grincamicina D Grincamicina E Grincamicina F			(Exceto Grincamicina F)	
Fluostatina I Fluostatina J Fluostatina K	Policetídeos	<i>Micromonospora rosaria</i>	-	ZHANG, W <i>et al.</i> , 2012
Kandenol A Kandenol B Kandenol C Kandenol D Kandenol E	Sesquiterpenos	<i>Streptomyces</i> sp.	Citotóxica	DING <i>et al.</i> , 2012
Lipoamicoumacina A Lipoamicoumacina B Lipoamicoumacina C Lipoamicoumacina D Bacilosarcina	Isocumarinas	<i>Bacillus subtilis</i>	-	LI <i>et al.</i> , 2012
Derivado Fenazina 1 Derivado Fenazina 1	Terpenóides	<i>Streptomyces</i> sp.	Citotóxica Anti-inflamatória	KONDRATYUK <i>et al.</i> , 2012
Kiamicina	Benzantraquinonas	<i>Streptomyces</i> sp.	Citotóxica	XIE, ZEPING <i>et al.</i> , 2012
<i>N</i> -[[3,4-diidro-3 <i>S</i> -hidroxi-2 <i>S</i> -metil-2-(4 <i>ϕ</i> <i>R</i> -metil-3 <i>ϕ</i> <i>S</i> -pentenil)-2 <i>H</i> -1-benzopirran-6-il]carbonil]-threonina	Alcaloide	<i>Streptomyces xiamenensis</i>	Antifibrótica	XU <i>et al.</i> , 2012
Pseudoalteromona B	Cetona	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	Anti-inflamatória	CHEN, Y <i>et al.</i> , 2012
Fradimicina A Fradimicina B Ácido Fradico A Ácido Fradico B	Antraquinonas (Fradimicinas A e B) Ácidos carboxílicos (Ácidos Fradicos A e B)	<i>Streptomyces fradiae</i>	Citotóxica Antibacteriana (Fradimicinas A e B)	XIN <i>et al.</i> , 2012
Citreamicina θ A	Xantonas	<i>Streptomyces caelestis</i>	Antibacteriana	LIU <i>et al.</i> , 2012

Revisão Bibliográfica

Citreamicina θ B Citreaglicona A Dehidrocitreaglicona A				
Ácido nahuóico A	Policetídeo	<i>Streptomyces</i> sp.	Citotóxica	WILLIAMS <i>et al.</i> , 2012
(R)-2-(heptan-3-il)-quinazolin-4(3H)-ona; (2R,3'R)-2-(heptan-3-il)-2,3-dihydroquinazolin-4(1H)-ona; (2S,3'R)-2-(heptan-3-il)-2,3-dihydroquinazolin-4(1H)-ona;	Alcaloides	<i>Bacillus cereus</i>	Antifúngica	XU <i>et al.</i> , 2011
22'-Deoxitiocoralina Tiochondrilina A Tiochondrilina B Tiochondrilina C 12'-sulfoxithiocoralina	Tiodesipeptídeos	<i>Micromonospora</i> sp.	Citotóxica (22'-deoxitiocoralina, tiochondrilina C e 12'- sulfoxithiocoralina)	WYCHE <i>et al.</i> , 2011
3,6,7-Tri-epi-invictolida	Terpenóide	<i>Nocardiopsis tangguensis</i>	-	SATO <i>et al.</i> , 2011
3-acetil-5-metil-20-deoxiuridina	Alcaloide	<i>Streptomyces microflavus</i>	-	LI <i>et al.</i> , 2011
3-hidroxi-1-ceto-3-metil-8-methoxi-1,2,3,4-tetrahidro-benz[α]antraceno	Cetona aromática	<i>Streptomyces</i> sp.	Citotóxica	ZHANG <i>et al.</i> , 2011
3-hidroxi-2-N-isobutiril-antranilamida	Benzamida	<i>Streptomyces</i> sp.	-	CHEN <i>et al.</i> , 2011
Actinoramida A Actinoramida B Actinoramida C	Peptídeo	<i>Streptomyces</i> sp.	-	NAM <i>et al.</i> , 2011
Amfibactina S Amfibactina T	Sideróforos	<i>Vibrio</i> sp.	-	VRASPIR, HOLT E BUTLER, 2011
Ansalactama A	Policetídeo	<i>Streptomyces</i> sp.	-	WILSON <i>et al.</i> , 2011
Antimicina A19 Antimicina A20	Bislactonas	<i>Streptomyces antibioticus</i>	Antifúngica	XU, L. Y. <i>et al.</i> , 2011
Aquachelina I	Sideróforos	<i>Halomonas meridiana</i>	-	VRASPIR, HOLT E

Aquachelina J				BUTLER, 2011
Azalomicina F5a 2-etilpentil éster Azalomicin F4a 2-etilpentil éster	Macrolídeos	<i>Streptomyces</i> sp.	Antifúngica	YUAN <i>et al.</i> , 2011
Bacilusamida A Bacilusamida B	Dicetopiperazina	<i>Bacillus</i> sp.	Antifúngica (Bacilusamida A)	YONEZAWA, YAMADA e KOUNO, 2011
Bendigole E	Esteroides	<i>Actinomadura</i> sp.	-	SIMMONS <i>et al.</i> , 2011
Benzoxacistol	Alcaloide	<i>Streptomyces griseus</i>	Citotóxica	NACHTIGALL <i>et al.</i> , 2011
Caerulomicina F Caerulomicina G Caerulomicina H Caerulomicina I Caerulomicina J Caerulomicina k	Alcaloides	<i>Actinoalloteichus cyanogriseus</i>	Citotóxica	FU <i>et al.</i> , 2011
Cianogrisida A Cianogrisida B Cianogrisida C Cianogrisida D	Alcaloides	<i>Actinoalloteichus cyanogriseus</i>	Citotóxica (Cianogrisida A e C)	FU <i>et al.</i> , 2011
Divergolida A Divergolida B Divergolida C Divergolida D	Macrolídeos	<i>Streptomyces</i> sp.	Citotóxica e Antibacteriana	DING <i>et al.</i> , 2011
Eritrazol A Eritrazol B	Diterpenos	<i>Erythrobacter</i> sp.	Citotóxica	HU e MACMILLAN, 2011
Fijimicina A Fijimicina B Fijimicina C	Depsipeptídeo	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacteriana	SUN <i>et al.</i> , 2011
Glucopiericidina C	Composto nitrogenado	<i>Streptomyces</i> sp.	Citotóxica e Antifúngica	SHAABAN <i>et al.</i> , 2011

Ieodomicina A Ieodomicina B Ieodomicina C Ieodomicina D	Ácido graxo	<i>Bacillus sp.</i>	Antibacteriana	MONDOL <i>et al.</i> , 2011
JBIR-56 JBIR-57	Alcaloides	<i>Streptomyces sp.</i>	-	MOTOHASHI <i>et al.</i> , 2011
Levantilida A Levantilida B	Macrolídeo	<i>Micromonospora sp.</i>	Citotóxica (Levantilida A)	GARTNER <i>et al.</i> , 2011
Loboforina C Loboforina D	Macrolídeos	<i>Streptomyces carnosus</i>	Citotóxica	WEI, P. <i>et al.</i> , 2011
Macrolactina I Macrolactina II Macrolactina III	Macrolídeo	<i>Bacillus sp.</i>	-	MONDOL, M. A. M. <i>et al.</i> , 2011
Macrolactina W	Macrolídeo	<i>Bacillus sp.</i>	Antibacteriana	MONDOL, M. A. M. <i>et al.</i> , 2011
Marinacarbolina A Marinacarbolina B Marinacarbolina C Marinacarboline D 13-N-demetil-metilpendolmicin; Metilpendolmicin-14-O- α -glicosídeo	Alcaloides	<i>Marinactinospora Thermotolerans</i>	Antiparasitária	HUANG <i>et al.</i> , 2011
Marinactinona A Marinactinona B Marinactinona C	Pironas	<i>Marinactinospora thermotolerans</i>	Citotóxica (Marinactinona B)	WANG <i>et al.</i> , 2011
N ₁ -acetil-N ₇ -fenilacetil cadaverina; Ciclo-(2-hidroxi-Pro-R-Leu)	Dicetopiperazina (Ciclo-(2-hidroxi-Pro-R-Leu))	<i>Streptomyces sp.</i>	Citotóxica	LI, B. <i>et al.</i> , 2011
Nobilamida A Nobilamida B Nobilamida C	Peptídeo	<i>Streptomyces sp.</i>	Antinociceptiva (Nobilamida B)	LIN <i>et al.</i> , 2011

Nobilamida D Nobilamida E				
Nobilamida F Nobilamida G Nobilamida H	Peptídeo	<i>Streptomyces</i> sp.	-	LIN <i>et al.</i> , 2011
Nocapirona E Nocapirona F Nocapirona G Nocazina A Nocazina B Nocazina C Nocazolina A	Pironas (Nocapironas E-G) Dicetopiperazinas (Nocazina A-C)	<i>Nocardiopsis dassonvillei</i>	Antibacteriana (Nocapironas E-G)	FU <i>et al.</i> , 2011
Norcardioazina A Norcardioazina B	Dicetopiperazinas	<i>Nocardiopsis</i> sp.	Anti-MDR (Norcardioazina A)	RAJU <i>et al.</i> , 2011
Padanamida B	Tetrapeptídeo	<i>Streptomyces</i> sp.	Citotóxica	WILLIAMS <i>et al.</i> , 2011
Piridinopirona A Piridinopirona B Piridinopirona C	Policetídeo	<i>Streptomyces</i> sp.	-	FUKUDA <i>et al.</i> , 2011
PM050511 PM050463 PM060054 PM060431	Pironas (lactonas)	<i>Streptomyces albus</i>	Citotóxica (PM050511 e PM060431)	SCHLEISSNER <i>et al.</i> , 2011
Pseudonocardiana A Pseudonocardiana B Pseudonocardiana C	Antraquinonas	<i>Pseudonocardia</i> sp.	Antibacteriana e Citotóxica (Pseudonocardiana A e B)	LI, S. <i>et al.</i> , 2011
Reveromicina E	Policetídeo	<i>Streptomyces</i> sp.		FREMLIN <i>et al.</i> , 2011
Salinosporamida K	β -lactona	<i>Salinispora pacífica</i>	Citotóxica	EUSTÁQUIO <i>et al.</i> , 2011
Solonamida A Solonamida B	Peptídeos	<i>Photobacterium halotolerans</i>	Antibacteriana	MANSSON <i>et al.</i> , 2011

Streptobactina Dibenartina Tribenartina	Sideróforos	<i>Streptomyces</i> sp.	Antioxidante	MATSUO <i>et al.</i> , 2011
Streptomicindol	Alcaloides	<i>Streptomyces</i> sp.	-	HUANG, X. L. <i>et al.</i> , 2011
Tetromicina 1 Tetromicina 2 Tetromicina 3 Tetromicina 4	Lactonas	<i>Streptomyces axinellae</i>	Antiparasitária	PIMENTEL-ELARDO <i>et al.</i> , 2011
Turnagainolida A Turnagainolida B	Peptídeo	<i>Bacillus</i> sp.	-	LI, D. <i>et al.</i> , 2011
Usabamicina A Usabamicina B Usabamicina C	Alcaloides	<i>Streptomyces</i> sp.	Citotóxica	SATO, S. <i>et al.</i> , 2011
Xiamicina B Indosespeno Sespenina	Sesquiterpenos	<i>Streptomyces</i> sp.	Antiviral	DING, L. <i>et al.</i> , 2010
2,3,5,7-Tetrabromobenzofuro[3,2-b]pirrol; 4,4',6-Tribromo-2,2'-bifenol	Composto fenólico Composto nitrogenado	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	Antibacteriana	FEHÉR <i>et al.</i> , 2010
2-oxoteleocidindina A ₁ -JBIR	Alcaloide	<i>Streptomyces</i> sp.	Citotóxica	IZUMIKAWA <i>et al.</i> , 2010
3-Formil-L-tirosil-treonina 3-Formil-L-tirosina	Aminoácidos	<i>Pseudoalteromonas tunicate</i>	-	BLASIAK E CLARDY, 2010
Ácido (2E)-11-(4'-aminofenil)-5,9-diidroxi-4,6,8-trimetil-11-oxo-undec-2-enóico; Ácido 9-(4'-aminofenil)-3,7-diidroxi-2,4,6-trimetil-9-oxo-nonóico; Ácido (2E)-11-(4'-aminofenil)-5,9-O-	Ácidos carboxílicos	<i>Streptomyces</i> sp.	Antiviral	WANG <i>et al.</i> , 2010

ciclo-4,6,8-trimetil-11-oxo-undec-2-enoico; Ácido 9-(4'-aminofenil)-3,7-O-ciclo-2,4,6-trimetil-9-oxo-nonóico				
Agabamicina A Agabamicina B Agabamicina C Agabamicina D Agabamicina E Agabamicina F Agabamicina G Agabamicina H	Alcaloides	<i>Vibrio</i> sp.	-	AL-ZEREINI <i>et al.</i> , 2010 YAO <i>et al.</i> , 2010
Arenjimicina	Quinona	<i>Salinispora arenicola</i>	Antibacteriana e Citotóxica	ASOLKAR <i>et al.</i> , 2010
Arsindolina A Arsindoline B	Alcaloide	<i>Aeromonas</i> sp.	-	CAI <i>et al.</i> , 2010
Barmumicina	Amida	<i>Streptomyces</i> sp.	-	LORENTE <i>et al.</i> , 2010
Benzonafitirindina	Alcaloide	<i>Streptomyces albogriseolus</i>	-	LI <i>et al.</i> , 2010
C ₁₄ -surfactina O-metil éster	Lipopeptídeo	<i>Bacillus pumilus</i>	-	ZHURAVLEVA <i>et al.</i> , 2010
Cimarina M Cimarina P Ciclomarazina M Ciclomarazina P	Peptídeo (Cimarina M e P) Dicetopiperazinas (Ciclomarazina M e P)	<i>Salinispora arenicola</i>	-	SCHULTZ <i>et al.</i> , 2010
Dermacozina A Dermacozina B Dermacozina C Dermacozina D Dermacozina E	Fenazinas	<i>Dermacoccus abyssi</i> sp.	Citotóxica Antioxidante	ABDEL-MAGEED <i>et al.</i> , 2010

Dermacozina F Dermacozina G				
Fijiolida A Fijiolida B	Macrolídeos	<i>Noccucliopsis</i> sp.	Citotóxica	NAM <i>et al.</i> , 2010
Fujiamicina	Quinona	<i>Streptomyces</i> sp.	-	ABDALLA <i>et al.</i> , 2010
Gifornenolona A Gifornenolona B	Diterpenos	<i>Verruscosispora</i> <i>gifhornensis</i>	-	SHIRAI <i>et al.</i> , 2010
Heronamida A Heronamida B Heronamida C	Amida	<i>Streptomyces</i> sp.	-	RAJU <i>et al.</i> , 2010
Heronapirrol A Heronapirrol B Heronapirrol C	Alcaloides	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacteriana	RAJU <i>et al.</i> , 2010
JBIR-34 JBIR-35	Alcaloide	<i>Streptomyces</i> sp.	Citotóxica	MOTOHASHI <i>et al.</i> , 2010
JBIR-46 JBIR-47 JBIR-48	Fenazinas	<i>Streptomyces</i> sp.	-	IZUMIKAWA <i>et al.</i> , 2010
JBIR-58	Amida	<i>Streptomyces</i> sp.	Citotóxica	UEDA <i>et al.</i> , 2010
JBIR-65	Diterpeno	<i>Actinomadura</i> sp.	Antioxidante	TAKAGI <i>et al.</i> , 2010
JBIR-66	Composto nitrogenado	<i>Saccharopolyspora</i> sp.	Citotóxica	TAKAGI, M. <i>et al.</i> , 2010
Macrolactina V	Lactona	<i>Bacillus</i> <i>amyloliquefaciens</i>	Antibacteriana	GAO <i>et al.</i> , 2010
Maiamicina	Antraquinona	<i>Streptomyces</i> sp.	Citotóxica	SCHNEEMANN <i>et al.</i> , 2010
Marinopirrol C Marinopirrol D Marinopirrol E Marinopirrol F	Alcaloides	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacteriana Citotóxica	HUGHES <i>et al.</i> , 2010 CHENG <i>et al.</i> , 2010

Nitropirrolina A Nitropirrolina B Nitropirrolina C Nitropirrolina D Nitropirrolina E	Alcaloides	Não identificado	Citotóxica	KWON <i>et al.</i> , 2010
Nocapirona A Nocapirona B Nocapirona C Nocapirona D	Pironas	<i>Nocardiopsis</i> sp.	-	SCHNEEMANN, I. <i>et al.</i> , 2010
Norardiatona A Norardiatona B Norardiatona A	Lactonas	<i>Nocardiopsis</i> sp.	-	LIN <i>et al.</i> , 2010
Publicatina A Publicatina B Publicatina C Publicatina D Publicatina E	Compostos fenólicos	<i>Streptomyces</i> sp.	-	LIN, Z. <i>et al.</i> , 2010
Raquicidina D	Peptídeo	<i>Streptomyces</i> sp.	Citotóxica	IGARASHI <i>et al.</i> , 2010
Saccharotrixmicina A Saccharotrixmicina B	Quinonas	<i>Saccharothrix espanensis</i>	-	KALINOVSKAYA <i>et al.</i> , 2010
Saliniquinona A Saliniquinona B Saliniquinona C Saliniquinona D Saliniquinona E Saliniquinona F	Antraquinonas	<i>Salinispora arenicola</i>	Citotóxica	MURPHY <i>et al.</i> , 2010
Tetracenoquinocina 5-iminoaranciamicina	Quinona	<i>Streptomyces</i> sp.	Citotóxica	MOTOHASHI, K. <i>et al.</i> , 2010
Trivancrobactina Divancrobacteria	Sideróforos	<i>Vibrio</i> sp.	-	SANDY <i>et al.</i> , 2010

Tumescenamida A Tumescenamida B	Peptídeo	<i>Streptomyces tumescens</i>	Antidiabética (Tumescenamida A)	MOTOHASHI, K. <i>et al.</i> , 2010
Xiamicina Xiamicina metil éster	Sequiterpenos	<i>Streptomyces</i> sp.	Citotóxica Antiviral	DING, L. <i>et al.</i> , 2010
10S-hidroxi-murol-4-en-3-ona 10S,13-diidroxi-murol-4-en-3-ona 10S,15-hidroxi-murol-4-en-3-ona 5,10S,11-trihidroxi-murol-4-en-3-ona	Sesquiterpenos	<i>Streptomyces</i> sp.	-	DING <i>et al.</i> , 2009
15-hidroxi-T-murolol 11,15-Diidroxi-T-murolol	Sesquiterpenos	<i>Streptomyces</i> sp.	-	DING <i>et al.</i> , 2009
6-Hidroximetil-1-fenazina- carboxamida 1,6-Fenazinadimetanol	Carboxamidas	<i>Brevibacterium</i> sp.	Antibacteriana	CHOI <i>et al.</i> , 2009
Ácido Lornéico A Ácido Lornéico B	Ácidos carboxílicos	<i>Streptomyces</i> sp.	Antiagregante plaquetária	IWATA <i>et al.</i> , 2009
Albidopirona	Pirona	<i>Streptomyces</i> sp.	Antidiabética	HOHMANN <i>et al.</i> , 2009
Amonificina A Amonificina B	Cromonas	<i>Thermovibrio ammonificans</i>	-	ADIANASOLO <i>et al.</i> , 2009
Amosamida A Amosamida B	Alcaloides	<i>Streptomyces</i> sp.	Citotóxica	HUGHES <i>et al.</i> , 2009
Anguciclinona	Quinona	<i>Saccharopolyspora taberi</i>	Citotóxica	PÉREZ <i>et al.</i> , 2009
Arenamida A Arenamida B Arenamida C	Peptídeos	<i>Salinispora arenida</i>	Citotóxica	PÉREZ <i>et al.</i> , 2009
Bacilistationa 1 Bacilistationa 2	Depsipeptídeos	<i>Bacillus silvestris</i>	Antibacteriana e citotóxica	PETTIT <i>et al.</i> , 2009
Chejuenolide C	Polieno	<i>Hahella chejuensis</i>	-	SEO E OH, 2009
Esplenocina A	Bis-lactonas	<i>Streptomyces</i> sp.	-	STRANGMAN <i>et al.</i> ,

Esplenocina B Esplenocina C Esplenocina D Esplenocina E Esplenocina F Esplenocina G Esplenocina H Esplenocina I Esplenocina J				2009
Faeocrimicina F Phaeochrmicis G Phaeochrmicis H	Policetídeos	<i>Streptomyces</i> sp.	-	LI <i>et al.</i> , 2009
Fenilnanolona A Fenilnanolona B Fenilnanolona C	Pironas	<i>Nannocystis exedens</i>	Citotóxica	SATO <i>et al.</i> , 2009
Hidroxidecilparabeno Hidroximetildecilparabeno Metildecilparabeno Dodec-5-enilparabeno	Compostos fenólicos	<i>Microbulbifer</i> sp.	Antibacteriana	QUÉVRAIN <i>et al.</i> , 2009
Indoxamicina A Indoxamicina B Indoxamicina C Indoxamicina D Indoxamicina E Indoxamicina F	Policetídeos	<i>Streptomyces</i> sp.		SATO, S. <i>et al.</i> , 2009
Iodopiridona	Alcaloide	<i>Saccharomonospora</i> sp.	Citotóxica	MALONEY <i>et al.</i> , 2009
Lipoamida A Lipoamida B Lipoamida C	Amidas	<i>Bacillus pumilus</i>	-	BERRUE <i>et al.</i> , 2009
Loihichelina A	Sideróforos	<i>Halomonas</i> sp.	-	HOMANN <i>et al.</i> , 2009

Loihichelina B Loihichelina C Loihichelina D Loihichelina E Loihichelina F				
Mansouramicina A Mansouramicina B Mansouramicina C Mansouramicina D	Quinonas	<i>Streptomyces</i> sp.	Citotóxica Antibacteriana Antimicroalga	HAWAS <i>et al.</i> , 2009
Marinosporolida A Marinosporolida B	Macrolídeos	<i>Marinispora</i> sp.	Antifúngica	KWON <i>et al.</i> , 2009
Naseseazina A Naseseazina B	Dicetopiperazinas	<i>Streptomyces</i> sp.	-	RAJU <i>et al.</i> , 2009
Neobacilamida A	Alcaloide	<i>Bacillus vallismortis</i>	-	YA <i>et al.</i> , 2009
Salinisporamicina	Quinona	<i>Salinispora arenicola</i>	Antibacteriana e Citotóxica	MATSUDA <i>et al.</i> , 2009
Tartrolona D	Macrolídeo	<i>Streptomyces</i> sp.	Citotóxica	PÉREZ <i>et al.</i> , 2009
Tirandamicina C Tirandamicina D	Compostos nitrogenados	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacteriana	CARLSON <i>et al.</i> , 2009
2-(<i>p</i> -hidroxibenzil)prodigiosina	Alcaloide	<i>Pseudoalteromonas rubra</i>	Citotóxica	FEHÉR <i>et al.</i> , 2008
4,10-diidroxi-10-metil-dodecan-4-olida Ácido 4,10-diidroxi-10-metil-dodecanóico	Ácidos graxos	<i>Streptomyces</i> sp.	-	SHAABAN <i>et al.</i> , 2008
Ác. diapolicopenedioico xilosil ester A Ác. diapolicopenedioico xilosil ester B Ác. diapolicopenedioico xilosil ester C	Carotenóides	<i>Rubritalea squalenifaciens</i>	Antioxidante (A)	SHINDO <i>et al.</i> , 2008
Ácido 5-dimetil-alilindol-3-carboxílico	Terpenóide	<i>Streptomyces</i> sp.	-	MOTOHASHI <i>et al.</i> , 2008
Ácido A809G-8'	Quinona	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacteriana	MOTOHASHI <i>et al.</i> ,

				2008
Ariacemicina A Ariacemicina B	Peptídeos	<i>Rapidithrix</i> sp.	Antibacteriana	OKU <i>et al.</i> , 2008
Bacilosarcina A Bacilosarcina B	Cumarinas	<i>Bacillus subtilis</i>	Antiprotozoária (Bacilosarcina A)	AZUMI <i>et al.</i> , 2008
Cebulactama A1 Cebulactama A2	Alcaloides	<i>Saccharopolypora cebuensis</i>	-	PIMENTEL-ELARDO <i>et al.</i> , 2008
Chejuenolida A Chejuenolida B	Polienos	<i>Hahella chejuensis</i>	Antidiabética	CHOI <i>et al.</i> , 2008
Ciclo-[fenlalanil-prolil-leucil-prolil] Ciclo-[isoleucil-prolil-leucil-alanil]	Peptídeos	<i>Pseudomonas</i> sp.		RUNGPROM <i>et al.</i> , 2008
Ciclomarazina A Ciclomarazina B	Dicetopiperazinas	<i>Salinispora arenicola</i>	-	RENNER <i>et al.</i> , 2008
Ciclomarina D	Peptídeo	<i>Salinispora arenicola</i>	-	RENNER <i>et al.</i> , 2008
Cinamoilfosforamida	Amida	<i>Streptomyces</i> sp.	Inibidor de acetilcolinesterase	QUITSCHAU <i>et al.</i> , 2008
Essramicina	Alcaloide	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacteriana	EL-GENDY <i>et al.</i> , 2008
Estreptofenazina A Estreptofenazina B Estreptofenazina C Estreptofenazina D Estreptofenazina E Estreptofenazina F Estreptofenazina G Estreptofenazina H	Fenazinas	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacteriana	MITOVA <i>et al.</i> , 2008
Linamicina A Linamicina B Linamicina C Linamicina D Linamicina E	Alcaloides	<i>Marinispora</i> sp.	Antibacteriana	McARTHUR <i>et al.</i> , 2008

Macrolactina S	Macrolídeo	<i>Bacillus</i> sp.	Antibacteriana	LU <i>et al.</i> , 2008
Marineosina A Marineosina B	Alcaloides	<i>Streptomyces</i> sp.	Citotóxica	BOONLARPPRADAB <i>et al.</i> , 2008
Marinopirrol A Marinopirrol B	Alcaloides	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacteriana e Citotóxica	HUGHES <i>et al.</i> , 2008
Não nomeado	Siderofóro	Não identificado	-	YOU <i>et al.</i> , 2008
Napiradiomicina	Meroterpenóide	<i>Streptomyces albus</i>	-	WINTER <i>et al.</i> , 2008
<i>N</i> -propionil-desacetil-micotial	Alcaloide	Não identificado	-	NEWTON <i>et al.</i> , 2008
Proximicina A	Alcaloides	<i>Verrucospora</i> sp.	Citotóxica	FIEDLER <i>et al.</i> , 2008 SCHNEIDER <i>et al.</i> , 2008
Proximicina B Proximicina C	Alcaloides	<i>Verrucospora maris</i>	Citotóxica Antibacteriana	FIEDLER <i>et al.</i> , 2008 SCHNEIDER <i>et al.</i> , 2008
Sacharotrixina A Sacharotrixina B Sacharotrixina C	Policetídeos	<i>Saccharothrix espanaensis</i>	Antibacteriana	KALINOVSKAYA <i>et al.</i> , 2008
Salinilactama A	Macrolactama	<i>Salinispora tropica</i>	-	SCHULTZ <i>et al.</i> , 2008
Salinipirona A Salinipirona B Pacifanena A Pacifanena A	Policetídeos	<i>Salinispora pacífica</i>	Imunomodulador (imunoestimulante) (Salinipirona B)	OH <i>et al.</i> , 2008
Sem nome	Etér	<i>Streptomyces</i> sp.	Antiparasitária	NA <i>et al.</i> , 2008
Unarmicin A Unarmicin C	Depsipeptídeos	<i>Photobacterium</i> sp.	Antibacteriana	OKU <i>et al.</i> , 2008
Zafrina	Cetona	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Antibacteriana	UZAIR <i>et al.</i> , 2008
Faecromicina F Faecromicina G Faecromicina H	Policetídeos	<i>Streptomyces</i> sp.	Citotóxica	LI, J. <i>et al.</i> , 2008
Ciclo-[fenilalanil-leucil] ₂	Peptídeos	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	Antibacteriana	RUNGROM <i>et al.</i> ,

Ciclo-[leucil-isoleucil] ₂				2008
Bromoalterocromida A Bromoalterocromida A'	Cromopeptídeo	<i>Pseudoalteromonas maricaloris</i>	Citotóxica	SPEITLING <i>et al.</i> , 2007
Lipoxazolidinona A Lipoxazolidinona B Lipoxazolidinona C	Alcaloides	<i>Marinispora</i> sp.	Antibacteriana	MACHERLA <i>et al.</i> , 2007
Salinosporamida D Salinosporomida F Salinosporomida G Salinosporomida H Salinosporomida I Salinosporomida J Bromo-salinosporomida	β-lactonas	<i>Salinispora tropica</i>	-	REED <i>et al.</i> , 2007
Salinicetal A Salinicetal B	Policetídeos	<i>Salinispora arenicola</i>	Citotóxica	WILLIAMS <i>et al.</i> , 2007
Arenicolida A Arenicolida B Arenicolida C	Macrolídeos	<i>Salinispora arenicola</i>	Citotóxica (Arenicolida B)	WILLIAMS <i>et al.</i> , 2007
Lucentamicina A Lucentamicina B Lucentamicina C Lucentamicina D	Peptídeos	<i>Nocardioopsis lucentensis</i>	Citotóxica (Lucentamicina A e B)	CHO <i>et al.</i> , 2007
Tauramamida	Lipopeptídeo	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	Antibacteriana	DESJARDINE <i>et al.</i> , 2007
Não nomeado	Fenazina	<i>Bacillus</i> sp.	Citotóxica	LI <i>et al.</i> , 2007
Octalactina C	Macrolídeo	<i>Streptomyces</i> sp.	-	CHEN <i>et al.</i> , 2007
10α,11-diidroxiamorph-4-eno 10α,15-diidroxiamorph-4-en-3-ona 5α,10α,11-diidroxiamorph-3-ona	Sesquiterpenos	<i>Streptomyces</i> sp.	-	WU <i>et al.</i> , 2007
Marmicina A	Antraquinonas	<i>Streptomyces</i> sp.	Citotóxica	MARTIN <i>et al.</i> , 2007

Marmicina B				
Piericidina C7 Piericidina C8	Compostos nitrogenados	<i>Streptomyces</i> sp.	Citotóxica	HAYAKAWA <i>et al.</i> , 2007
Piperazimicina A Piperazimicina B Piperazimicina C	Depsipeptídeos	<i>Streptomyces</i> sp.	Citotóxica	MILLER <i>et al.</i> , 2007
Atrop-abissomicina C Abissomina G Abissomina H	Policetídeos	<i>Verrucosipora</i> sp.	Antibacteriana (Atrop-abissomicina C)	KELLER <i>et al.</i> , 2007
Tenacibactina A Tenacibactina B Tenacibactina C Tenacibactina D	Sideróforos	<i>Tenacibaculum</i> sp.	Antioxidante	JANG <i>et al.</i> , 2007
Thalassospiramida A Thalassospiramida B	Peptídeos	<i>Thalassospira</i> sp.	Imunossupressiva	OH <i>et al.</i> , 2007
5- <i>cis</i> -3-oxo-C ₁₂ -HSL 5- <i>cis</i> -C ₁₂ -HSL	Lactonas	<i>Mesorhizobium</i> sp.	Antibacteriana e citotóxica (5- <i>cis</i> -3-oxo-C ₁₂ -HSL)	KRICK <i>et al.</i> , 2007
Ácido (4-hidroxi-3,5-dinitrofenil)- propionico metil ester; Ácido 2-cloro-3-(4-hidroxi-3,5- dinitrofenil)-propionico metil ester; Ácido 2-hidroxi-3-(4-hidroxi-3- nitrofenil)-propionico metil ester; Ácido 2-(4-hidroxi-3,5-dinitrofenil)- etil chlorídrico	Compostos fenólicos	<i>Salegentibacter</i> sp.	-	AL-ZEREINI <i>et al.</i> , 2007
Urukthapelstatina A	Peptídeo	<i>Mechercharimuces asporrophorigenens</i>	Citotóxica	MATSUO <i>et al.</i> , 2007
4,4-dimetil-1,2,3-tritriolana 4,4,6,6-tetrametil-1,2,5-trithiepano	Polissulfetos	<i>Cytophaga</i> sp.	-	SOBIK <i>et al.</i> , 2007

Revisão Bibliográfica

3,3,7,7-tetrametil-1,2,5-trithiepano 3,3,6,6-tetrametil-1,2,5-trithiepano 3,3,7,7-tetrametil-1,2,5,6-tetratiocano 8,3,8,8-tetrametil-1,2,5,6-tetrathiocana 5,5-dimetil-1,2,3,4-tetratiano				
Marinobactina F	Composto nitrogenado	<i>Marinobacter</i> sp.	-	MARTINEZ E BUTLER, 2007
Ácido acil glicocarotenóico	Carotenoide	<i>Rubritalea squalenifaciens</i>	Antioxidante	SHINDO <i>et al.</i> , 2007
Marinomicina A Marinomycin B Marinomicina C Marinomicina D	Macrolídeos	<i>Marinispora</i>	Antibacteriana (Marinomicina A e D) Citotóxica (Marinomicina A e C)	KWON <i>et al.</i> , 2006
Cianosporasida A Cianosporasida B	Terpenoides	<i>Salinispora pacifica</i>	-	OH <i>et al.</i> , 2006
Ácido 3-(4'-hidroxifenil)-4-fenilpirrol-2,5-dicarboxílico Ácido 3,4-bis(4'-hidroxifenil)-pirrol-2,5-dicarboxílico	Ácidos carboxílicos	<i>Halomonas</i> sp.	-	WANG <i>et al.</i> , 2006
2-amino-8-(4-hidroxibenzoil)-6-hidroxifenoxazin-3-ona 2-amino-8-benzoil-6-hidroxifenoxazin-3-ona 2-amino-8-(4-hidroxibenzoil)-6-hidroxifenoxazin-3-ona	Compostos nitrogenados	<i>Halomonas</i> sp.	Antibacteriana e citotóxica (1 e 3)	BITZER <i>et al.</i> , 2006
Actinofuranona A Actinofuranona B	Policetídeos	<i>Streptomyces</i> sp.	-	CHO <i>et al.</i> , 2006
Azamerona	Terpenóide	<i>Streptomyces</i> sp.	-	CHO <i>et al.</i> , 2006
Dariamida A	Amidas	<i>Streptomyces</i> sp.	Citotóxica e Antifúngica	ASOLKAR <i>et al.</i> , 2006

Dariamida B Dariamida C Ácido (2E, 4E)-7-metil-octa-2,4-dienóico				
N-carboxamida-estaurosporina (5S, 8S, 9R, 10S)-selina-4(14),7(11)-diene-8,9-diól 5,7-diidroxi-5,6,7,8-tetrahydro-1H-azocin-2-ona	Carboxamida Sesquiterpeno Alcaloide	<i>Streptomyces</i> sp.	Citotóxica e antibacteriana (N-carboxamida-estaurosporina)	WU <i>et al.</i> , 2006 FOTSO <i>et al.</i> , 2006
(1 α , 4 α , 5 α , 7 β , 8 $\alpha\beta$)-5,8a-dimetil-decahidrona-fitaleno-1,4a, 7-triol	Sesquiterpeno	<i>Streptomyces</i> sp.	-	XIE <i>et al.</i> , 2006
Bohemamina B Bohemamina C 5- Clorobohemamina C	Alcaloides	<i>Streptomyces</i> sp.	-	BUGNI <i>et al.</i> , 2006
Urauchimicina C Urauchimicina D	Alcaloides	<i>Streptomyces</i> sp.	-	YAO <i>et al.</i> , 2006
Estreptocordina 8-hidroxi-3-metoxi-1-propil-antraquinona 3,8-diidroxi-1-propil-antraquinona	Antraquinonas (2 e 3)	<i>Streptomyces</i> sp.	Citotóxica e Antibacteriana	JEONG <i>et al.</i> , 2006
1,6-diidroxi-8-propil-antraquinona 5-carboximetil-2-propil-cromona 1,8-diidroxi-2-etil-3-metil-antraquinona	Cromona Antraquinonas	<i>Streptomyces</i> sp.	Citotóxica	HUANG <i>et al.</i> , 2006
N,N-diacetiltritamina	Composto nitrogenado	<i>Roseivirga echinicomitans</i>	Citotóxica	OLENIKOVA <i>et al.</i> , 2006
Bisantraquinona 1 Bisantraquinona 2 Bisantraquinona 3	Antraquinonas	<i>Streptomyces</i> sp.	Citotóxica e Antibacteriana	SOCHA <i>et al.</i> , 2006

Vanchobactina	Sideróforo	<i>Vibrio anguillarum</i>	-	SOENGAS <i>et al.</i> , 2006
Salinosporamida B Salinosporamida C Esporolida A Esporolida B	β -lactona (Salinosporamida B e C) Macrolídeos (Esporolidas A e B)	<i>Salinispora tropica</i>	Citotóxica (Salinosporamida B)	WILLIAMS <i>et al.</i> , 2005 BUCHANAN <i>et al.</i> , 2005
3-Cloro-10a-(3-cloro-6-hidroxi-2,2,6-trimetilciclorohexilmetil)-6,8-diidroxi-2,2,7-trimetil-3,4,4a,10a-tetrahidro-2H-benzo[g]cromeno-5,10-diona; 3-Cloro-10a-(3-cloro-6-hidroxi-2,2,6-trimetilciclorohexilmetil)-6,8-diidroxi-2,2,7-trimetil-3,10a-diidro-2H-benzo[g]cromeno-5,10-diona; 3-Cloro-10a-(3-cloro-6-hidroxi-2,2,6-trimetilciclorohexilmetil)-6,8-diidroxi-2,2,7-trimetil-3,4,4a,10a-tetrahidro-2H-benzo[g]chromeno-5,10-diona; 3-Cloro-10a-(3-cloro-6-hidroxi-2,2-dimethyl-6-metileneciclorohexilmetil)-6,8-diidroxi-2,2,7-trimetil-3,4,4a,10a-tetrahidro-2H-benzo[g]cromeno-5,10-diona	Hidroquinonas	Não identificada	Antibacteriana e Citotóxica	SORIA-MERCADO <i>et al.</i> , 2005
Talusina	Ácido carboxílico	Não Identificada	-	MATSUO <i>et al.</i> , 2005
Merchercharmicina A Merchercharmicina B	Peptídeos	<i>Thermoactinomyces</i> sp.	Citotóxica (Merchercharmicina A)	KANOH <i>et al.</i> , 2005 ROMERO <i>et al.</i> , 2005
Análogo da tambjamina	Alcaloide	<i>Pseudoalteromonas tunicate</i>	-	FRANKS <i>et al.</i> , 2005
Ciclo-(D-pipecolinil-L-isoileucina)	Dicetopiperazina	<i>Pseudoalteromonas haloplank</i>	-	MITOVA <i>et al.</i> , 2005
Ciclo-(D-pipecolinil-L-leucine)	Peptídeos	<i>Pseudoalteromonas</i>	Antioxidante	MITOVA <i>et al.</i> , 2005

Ciclo-(L-pipecolinil-L-fenilalanina)		<i>haloplank</i>	(Ciclo-(L-pipecolinil-L-fenilalanina)	
Lajolamicina	Composto nitrogenado	<i>Streptomyces nodsus</i>	Antibacteriana	MANAM <i>et al.</i> , 2005
Chinicomicina A Chinicomicina B	Compostos nitrogenados	<i>Streptomyces</i> sp.	Citotóxica	MASKEY <i>et al.</i> , 2005
Dehidroxinocardimina Desmetilenilocardimina	Peptídeos	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacteriana	LEE <i>et al.</i> , 2005
Glaciapirrol A Glaciapirrol B Glaciapirrol C	Sesquiterpenos	<i>Streptomyces</i> sp.	Citotóxica (Glaciapirrol A)	MACHERLA <i>et al.</i> , 2005
1-hidroxi-1-norresistomicina	Composto fenólico	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacteriana Citotóxica	KOCK <i>et al.</i> , 2005 GORAJANA <i>et al.</i> , 2005
Feigrisolida	Ácido carboxílico	<i>Streptomyces griseus</i>	-	KIM <i>et al.</i> , 2005
Lactona não nomeada Lactona não nomeada Lactona não nomeada 10-metildodecan-5-olídeo 10-metildodec-2-en-4-olídeo 10-metildodec-3-en-4-olídeo	Lactonas	<i>Streptomyces</i> sp	-	DICKSCHAT <i>et al.</i> , 2005
(7 <i>S</i> *,9 <i>R</i> *,10 <i>R</i> *)-pyrromicina (7 <i>R</i> *,9 <i>S</i> *,10 <i>R</i> *)-pyrromicina 1-hidroxiauramicina T 1-hidroxisulfurmicina T	Antraquinonas	<i>Streptomyces</i> sp.	Citotóxica	PHIPPS <i>et al.</i> , 2004
ZHD-051	Alcaloide	<i>Actinomadura</i> sp.	Citotóxica	HAN <i>et al.</i> , 2005
(+)-curcutraol (-)-curcutraol	Sesquiterpenos	Não identificada		MULHAUPT <i>et al.</i> , 2005
2,5-Dimetil-3-(metil-sulfanil) pirazina	Composto nitrogenado	<i>Loktanella</i> sp.	-	DICKSCHAT, J.S. <i>et al.</i> , 2005
Diazepinomicina	Alcaloide	<i>Micromonospora</i> sp.	Antibacteriana	CHARAN <i>et al.</i> , 2004

Gutingimicina Trioxacarcina D Trioxacarcina E Trioxacarcina F	Alcaloide Cetonas aromáticas	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacteriana Citotóxica e Antiparasitária (Trioxacarcin D)	MASKEY <i>et al.</i> , 2004
8-amino-[1,4]-diazonane-2,5-diona Leucil-4-hidroprolina	Dipeptídeo	<i>Streptomyces acrimycini</i>	-	HERNÁNDEZ <i>et al.</i> , 2004
Aureoverticilactama	Macrolactama	<i>Streptomyces aureoverticillatus</i>	Citotóxica	MITCHELL <i>et al.</i> , 2004
(R)-10-metil-6-undecanolida (6R,10S)-10-metil-6-dodecanolida	Caprolactonas	<i>Streptomyces</i> sp.	Citotóxica	STRITZKE <i>et al.</i> , 2004
Mixirina A Mixirina B Mixirina C	Peptídeos	<i>Bacillus</i> sp.	Citotóxica	ZHANG <i>et al.</i> , 2004
Petrobactina sulfonada	Sideróforos	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	-	HICKFORD <i>et al.</i> , 2004
Abisomicina B Abisomicina C Abisomicina D	Cetonas	<i>Verrucosispora</i> sp.	Antibacteriana (Abisomicina D)	BISTER <i>et al.</i> , 2004 RIEDLINGER <i>et al.</i> , 2004
Helquinolina N-actilcinuramina	Compostos nitrogenados	<i>Janibacter limosus</i>	Antibacteriana (Helquinolina)	ASOLKAR <i>et al.</i> , 2004
Ciclo-(glicil-L-seril-L-prolil-L-glutamil) Ciclo-(glicil-L-prolil-L-glutamil)	Peptídeos	<i>Ruegeria</i> sp.	-	MITOVA <i>et al.</i> , 2004
<i>cis</i> -4-hidroxi-D-prolina	Peptídeo	<i>Ruegeria</i> sp.	-	MITOVA <i>et al.</i> , 2004
Salinosporamida A	β -lactona	<i>Salinispora</i> sp.	Citotóxica	FELING <i>et al.</i> , 2003
Nocatiacina I Nocatiacina II Nocatiacina III	Peptídeos	<i>Nocardia</i> sp.	Antibacteriana	LEET <i>et al.</i> , 2003 LI <i>et al.</i> , 2003
YM-266183 YM-266184	Peptídeos	<i>Bacillus cereus</i>	Antibacteriana	NAGAI <i>et al.</i> , 2003; SUZUMURA <i>et al.</i> ,

				2003
Bacilamida	Peptideo	<i>Bacillus</i> sp.	Antimicroalga	JEONG <i>et al.</i> , 2003
Ciclo (L-prolil-D-prolil-L-tirosil-L-tirosil)	Peptídeo	<i>Pseudomonas</i> sp.	-	MITOVA, TOMMONARO e DE ROSA, 2003
Bonactina	Ácido carboxílico	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacteriana Antifúngica	SCHUMACHER <i>et al.</i> , 2003
Parimicina	Antraquinona	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacteriana Citotóxica	MASKEY <i>et al.</i> , 2003
6-prenilriptofol Alcaloide não nomeado Alcaloide não nomeado	Alcaloides	<i>Streptomyces</i> sp.	Citotóxica	SÁNCHEZ LÓPEZ <i>et al.</i> , 2003
Komodoquinona A Komodoquinona B	Antraquinonas	<i>Streptomyces</i> sp.	Citotóxica	ITOH <i>et al.</i> , 2003
Neoverrucosana-5 β ,9 β -diol Neoverrucosana-5 β ,18-diol Neoverrucosana-5 β ,9 β ,18 β -triol Neoverrucosana-5 β ,9 β -diol-4-carboxaldeido	Diterpenos	<i>Saprospira grandis</i>	-	SPYERE <i>et al.</i> , 2003
<i>cis</i> -Haliangicina Haliangicina B Haliangicina C Haliangicina D Haliangicina	Polienos	<i>Haliangium ochraceum</i>	Antifúngica	KUNDIM <i>et al.</i> , 2003
Pseudoalterobactina A Pseudoalterobactina B	Sideróforos	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	Antioxidante	KANOH <i>et al.</i> , 2003
3,3',5,5'-tetrabromo-2,2'-bifenildiol	Compostos fenólicos	<i>Pseudoalteromonas phenolica</i> sp.	Antibacteriana	ISNANSETYO e KAMEI, 2003
Ciclo(D)-Pro-(D)-Leu; Ciclo(D)-Pro-(D)-Val;	Dicetopiperazinas	Não identificada	Antibacteriana	FDHILA <i>et al.</i> , 2003

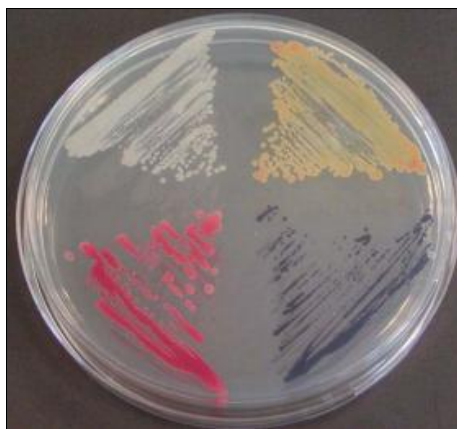
Ciclo(D)-Pro-(D)-Ile; Ciclo-trans-4-OH-(D)-Pro-(D)-Phe				
IB-00208	Xantona	<i>Actinomadura</i> sp.	Citotóxica	MASKEY <i>et al.</i> , 2003
Chandrananimicina A Chandrananimicina B Chandrananimicina C	Alcaloides	<i>Actinomadura</i> sp.	Citotóxica	MASKEY <i>et al.</i> , 2003

3. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE AS BACTÉRIAS MARINHAS ESTUDADAS

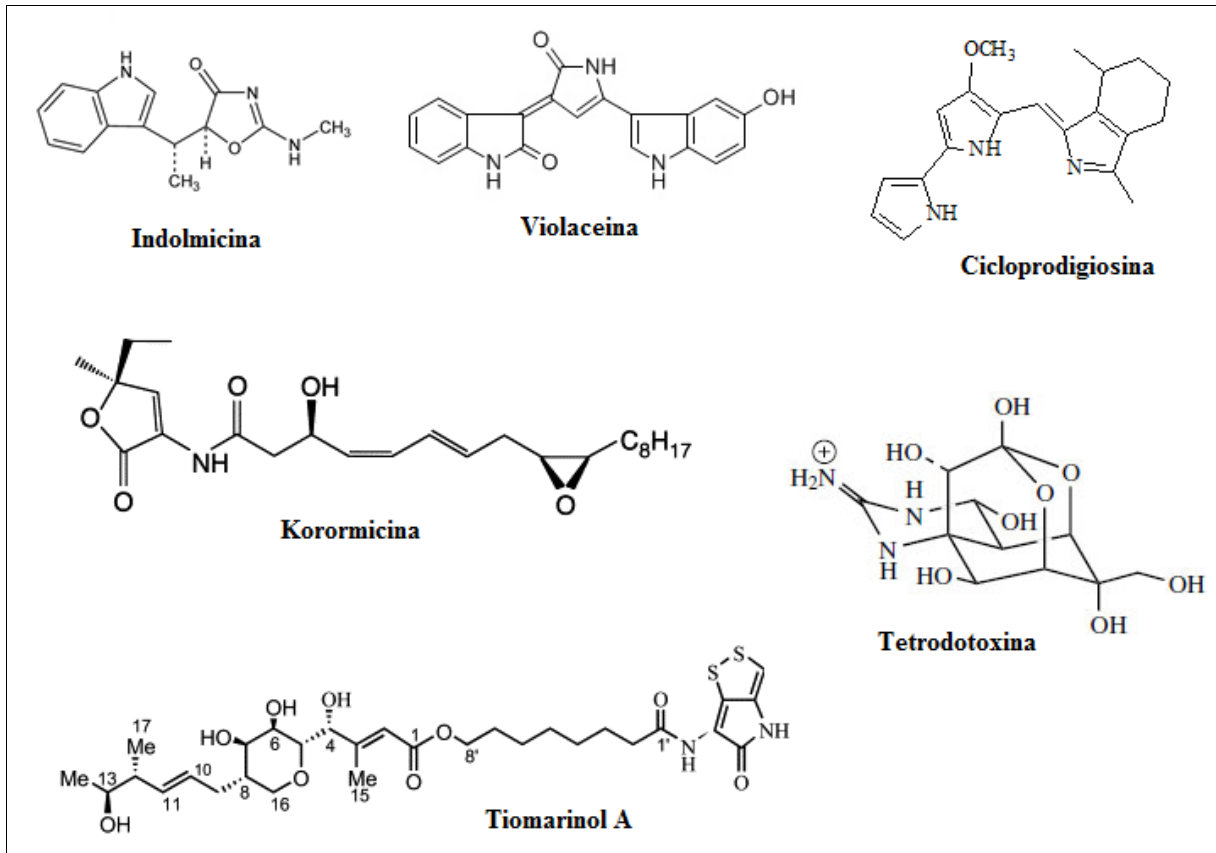
3.1 *Pseudoalteromonas* sp.

O gênero *Pseudoalteromonas* foi formalmente descrito por Gauthier e colaboradores em 1995 com base na análise de sequências de genes de rRNA para acomodar 11 espécies previamente descritas como pertencentes ao gênero *Alteromonas*. É constituído por bactérias gram-negativas pertencentes as γ -proteobactérias e está presente em águas marinhas onde constituem de 0,5% a 6% do bacterioplâncton total (WIETZ *et al.* 2010). São bactérias aeróbias heterotróficas e não-fermentadoras, e as células são móveis por um ou mais flagelos. Atualmente o gênero abrange 36 espécies, incluindo as que foram recentemente descritas (OH & PARK, 2011; XU *et al.*, 2010). O gênero divide-se em dois grupos: espécies pigmentadas e não-pigmentadas, onde as espécies pigmentadas são as responsáveis pela maior produção de metabólitos secundários bioativos (BOWMAN, 2007). A Figura 1 mostra cepas de espécies de *Pseudoalteromonas* pigmentadas e não pigmentada cultivada em meio marinho.

Figura 1: Cepas de espécies de *Pseudoalteromonas* cultivadas em ágar marinho (*P. agarivorans* - não pigmentada; *P. flavipulchra*, - amarelo; *P. luteoviolacea* - roxo escuro e *P. rubra* - vermelha).



A diversidade química dos compostos isolados de espécies de *Pseudoalteromonas* é surpreendente, principalmente quando se considera compostos com ação antibacteriana ou citotóxica, tornando esse gênero um alvo interessante na descoberta de novos compostos bioativos com aplicações tanto farmacêuticas quando industriais. O Quadro 1 (p. 52) mostra alguns metabólitos bioativos isolados de cepas de *Pseudoalteromonas*.

Quadro 1: Metabólitos bioativos isolados de espécies de pseudoalteromonas

É importante comentar que as espécies de *Pseudoalteromonas* não são agentes patogênicos humanos, pois não crescem bem a 37 ° C, e não existem relatos na literatura de doenças infecciosas humanas causadas por bactérias desse gênero (CHAU *et al.*, 2011).

3.2 *Micromonospora* sp.

As bactérias pertencentes à ordem dos Actinomycetales, comumente conhecidas como actinomicetos, têm provado ser uma fonte abundante de novos compostos bioativos (JENSEN, *et al.*, 2005). Os metabólitos secundários produzidos por actinomicetos apresentam um amplo espectro de atividades biológicas incluindo antibacteriana, antifúngica, anti-protozoária, anti-helmíntica, antiviral, inseticida, anti-oxidante, citotóxica e anti-inflamatória (KEKUDA, *et al.*, 2010). Entre os vários gêneros que compõem os Actinomycetales, o gênero *Micromonospora* tem sido intensivamente investigado.

Micromonospora (Mikros = pequeno, mono = um e spora = esporo) foi descrita por Ørskov em 1923 e as bactérias que constituem este gênero se caracterizam por possuírem micélio vegetativo, esporos únicos sensíveis ao calor e por não possuírem micélio aéreo. As colônias que crescem em meio sólido inicialmente tem uma cor amarela ou laranja claro, que vai mudando para laranja, vermelho, marrom, azul esverdeado ou roxo. Na maturidade as colônias adquirem cores progressivamente mais escuras com a produção de esporos marrom-preto, verde-preto ou pretos e se tornam mucosas (LUEDEMANN & CASMER, 1973). A Figura 2 exemplifica colônias de *Micromonospora* sp.

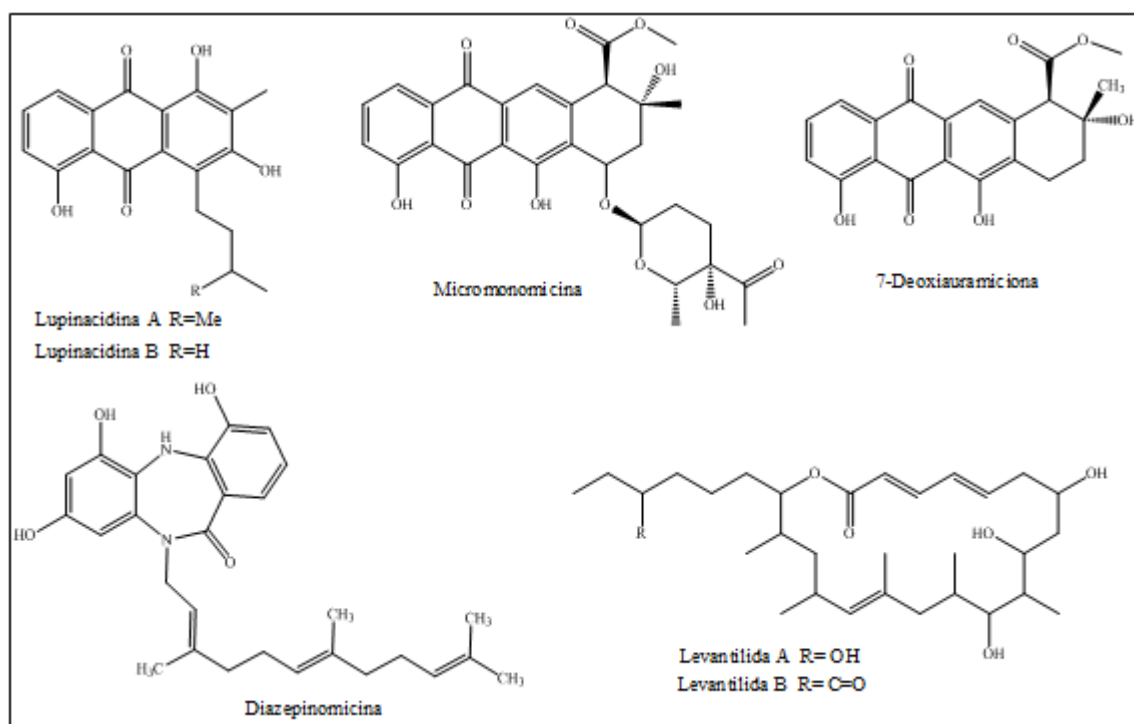
Figura 2: Colônias de *Micromonospora* ssp.



O gênero *Micromonospora* foi isolado pela primeira vez em amostras de solo, no entanto, cada vez mais se encontram novas espécies em outros *habitats*. Jensen (1932), encontrou espécies de *Micromonospora* em solos da Austrália e, posteriormente, Kriss (1939), em solos russos, contudo, são em ambientes aquáticos como lagos, lodos e sedimentos fluviais onde, hoje em dia, se isolam com mais frequência exemplares desse gênero (HIRSCH *et al.*, 2004).

Cepas de *Micromonospora* também tem sido isoladas de ambientes marinhos, como areia da praia (ZHAO, *et al.*, 2004), sedimentos das profundidades marinhas (WEYLAND, 1969), sedimentos do Mar Branco e Mar Negro (SOLOVIEVA, 1972; SOLOVIEVA e SINGAL, 1972) e mais recentemente de esponjas marinhas (ZHANG *et al.*, 2006). Os metabólitos secundários, tais como antraquinonas (IGARASHI, *et al.*, 2011; YANG, *et al.*, 2004), alcalóides (CHARAN, *et al.*, 2004), antraciclinas e macrolídeos (GARTNER, *et al.*, 2011) têm sido isolados a partir de *Micromonospora* sp. de origem marinha. O Quadro 2, mostra alguns metabólitos secundários isolados de espécies do gênero *Micromonospora* de origem marinha.

Quadro 2: Metabólitos secundários isolados de *Micromonospora* sp. de origem marinha

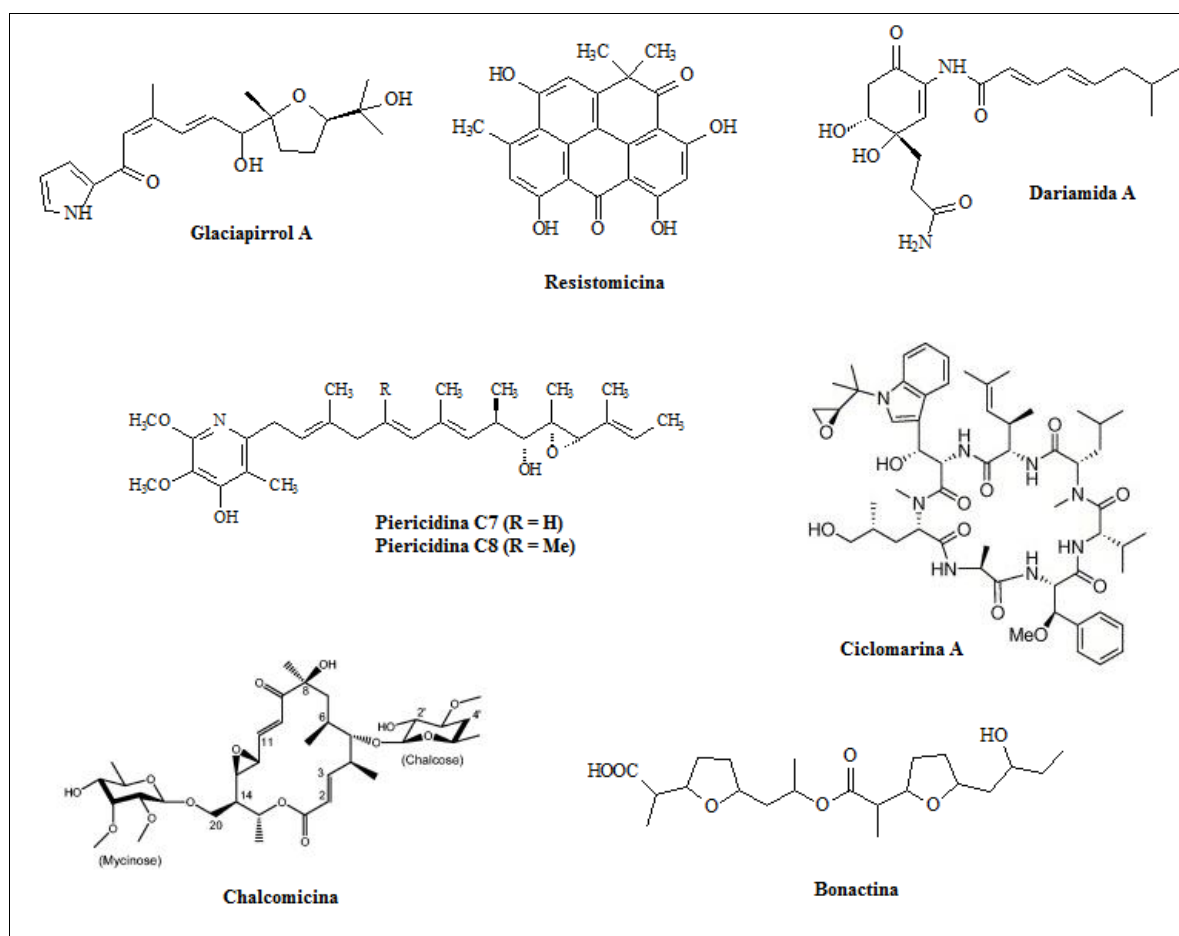


3.3 *Streptomyces* sp.

Streptomyces é o maior gênero de actinobactérias, abrangendo atualmente cerca de 576 espécies (LABEDA, 2010). É constituído por bactérias filamentosas, gram-positivas e aeróbicas encontradas predominantemente no solo e na vegetação em decomposição, mas também são encontradas em amostras de sedimentos e organismos marinhos. Espécies desse gênero possuem um metabolismo secundário complexo e são responsáveis pela produção de mais de dois terços dos antibióticos clinicamente úteis de origem natural presentes no mercado, por exemplo, neomicina e o cloranfenicol (EL-GENDY *et al.*, 2008b).

Espécies de *Streptomyces* verdadeiramente marinhas têm provado serem eficientes na produção de novos metabolitos secundários (SOLANKI *et al.*, 2008), que mostram uma variedade de atividades biológicas, tais como antifúngica, anti-tumoral, anti-bacteriana, imunossupressora, inseticida e enzimática. O Quadro 3 mostra alguns compostos isolados de espécies de *Streptomyces* marinhas.

Quadro 3: Compostos bioativos isolados a partir de cepas de *Streptomyces* marinhas



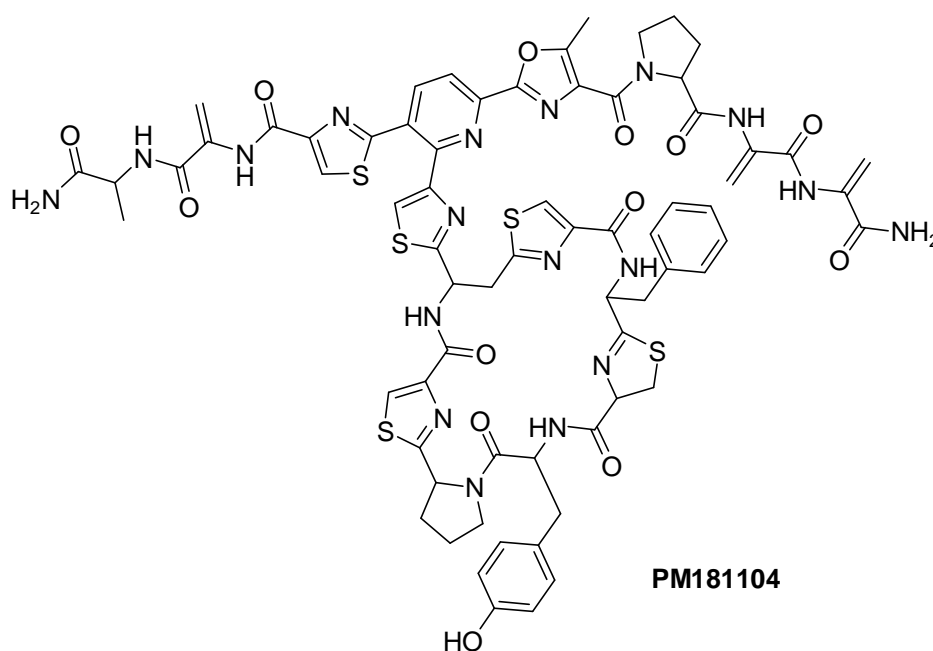
3.4 *Kocuria* sp.

O gênero *Kocuria*, chamado assim em homenagem ao microbiólogo eslovênio Miroslav Kocur, foi criado em 1995 para englobar bactérias gram-positivas estritamente aeróbicas e não formadoras de endosporos que anteriormente eram incluídas no gênero *Micrococcus*. *Kocuria* ssp. são claramente separáveis de *Micrococcus* e de outras bactérias gram-positivas com base nas sequências de genes distintas de 16S rRNA. Na sua versão mais atual, o gênero *Kocuria* é composto por 16 espécies (SALAS-SEGURA, 2007).

Membros do gênero *Kocuria* e *Micrococcus* são distribuídos em uma ampla variedade de ambientes naturais tais como solo, água doce, sedimentos marinhos e alimentos fermentados. Muitas vezes, espécies desses gêneros são utilizadas na indústria alimentícia como fermentos, para promover o desenvolvimento e estabilidade da cor vermelha (por meio da redução de nitrato a nitrito), para evitar o ranço (por meio da decomposição de peróxido), para manter a segurança higiênica dos alimentos (pela permanência de nitrito) e para contribuir no sabor em produtos de carnes fermentadas (SILVA, 2012).

A Figura 3 abaixo mostra o único metabólido secundário encontrado para o gênero *Kocuria*. Trata-se de um peptídeo com propriedades antibacteriana descrito em uma patente dos Estados Unidos publicada por Mahajan, 2009.

Figura 3: Peptídeo antimicrobiano PM181104 isolado do gênero *Kocuria*



4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 *Pseudoalteromonas* sp.

Trinta e duas cepas foram isoladas da amostra de sedimento coletado na praia da Taíba, mas apenas 13, as estritamente marinhas, foram selecionadas para a extração e avaliação da atividade citotóxica. Entre estas, quatro demonstram atividade biológica inibindo a proliferação de células tumorais na concentração de 50 µg/mL como mostra a Figura 4 (p.58). As linhagens testadas no ensaio foram SF-295 (glioblastoma), HCT-8 (cancêr de cólon), MDA-MB-435 (melanoma) e HL-60 (leucemia promielocítica). O extrato mais ativo foi o da BRA-007, obtido por extração com AcOEt, o qual inibiu quase 100% do crescimento de todas as linhagens celulares testadas, sendo este, portanto, selecionado para produção em grande escala.

A caracterização morfológica preliminar de BRA-007 indicou que este micro-organismo isolado tratava-se de uma bactéria marinha de coloração vermelha, gram-negativa. Com base no alinhamento da sequência de 16S rRNA e comparação com a base de dados GenBank, a sequência do gene de BRA-007 mostrou maior semelhança com a espécie *Pseudoalteromonas rubra* (99% de similaridade). Com essas informações foi utilizado o programa EzTaxon server 2.1 para alinhar a sequência de genes do micro-organismo isolado com diversas cepas de *Pseudoalteromonas* onde foram encontrados valores de similaridade de 99,68% com *P. rubra*. A análise filogenética de BRA-007 permitiu incluí-la dentro do gênero *Pseudoalteromonas* e também indicou que a *P. rubra* é um taxon irmã com um valor de bootstrap de 97 (Fig. 5, p.59).

O extrato AcOEt de *Pseudoalteromonas* sp. foi fracionado utilizando cromatografia gravitacional em gel de sílica e cromatografia em camada delgada, proporcionando o isolamento de três metabólitos (**P-1** a **P-3**) e a identificação de 7 ácidos graxos na forma de seus ésteres metílicos.

Figura 4: Atividade citotóxica dos extratos dos micro-organismos isolados do sedimento marinho da praia da Taíba. Linhagens utilizadas: HL60, SF 295, HCT-8 e MDA-MB-435. Concentração de 50µg/mL usando o o ensaio Alamar após 72 horas de incubação. A doxorubicina foi usada como padrão positivo.

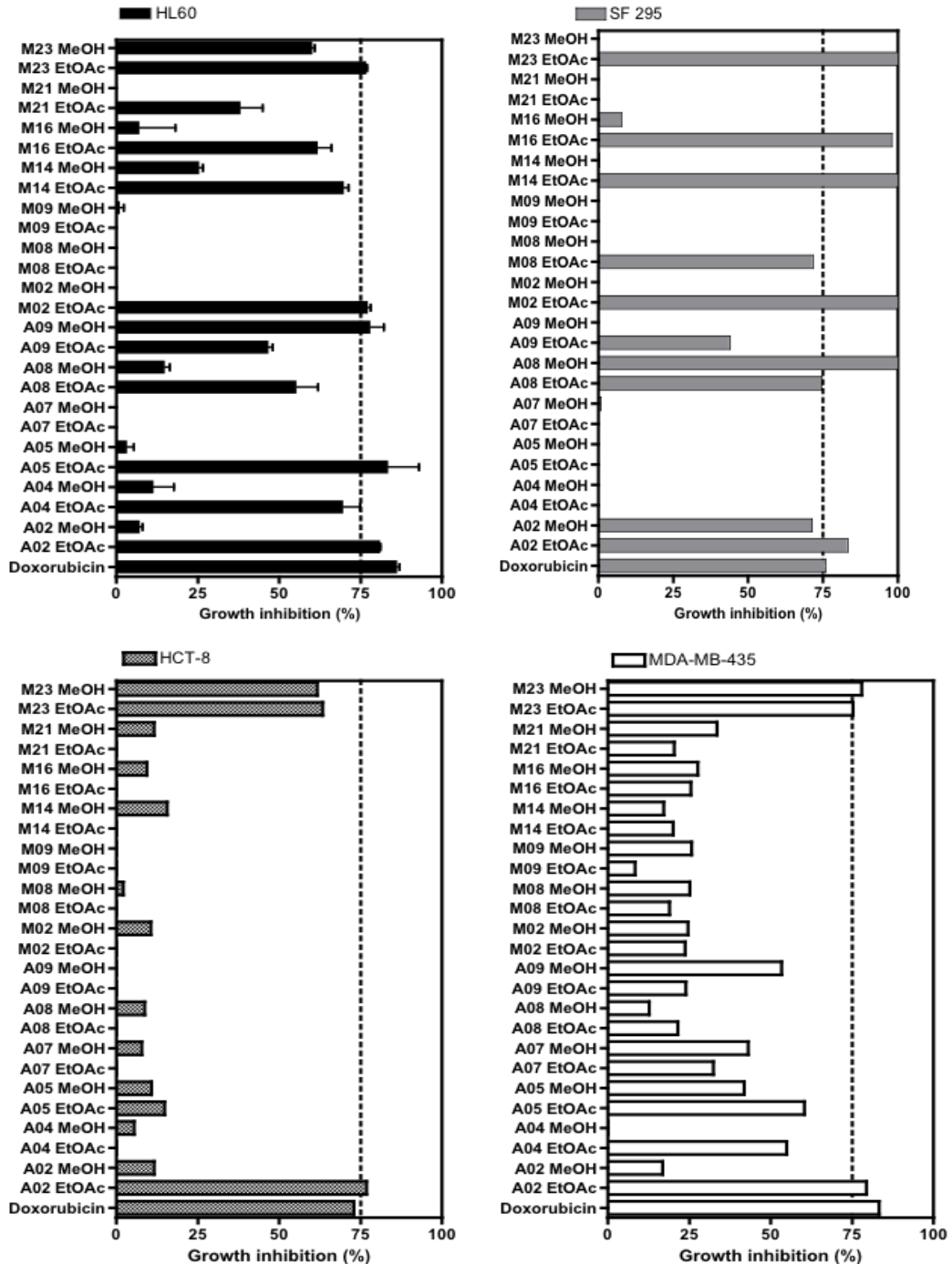
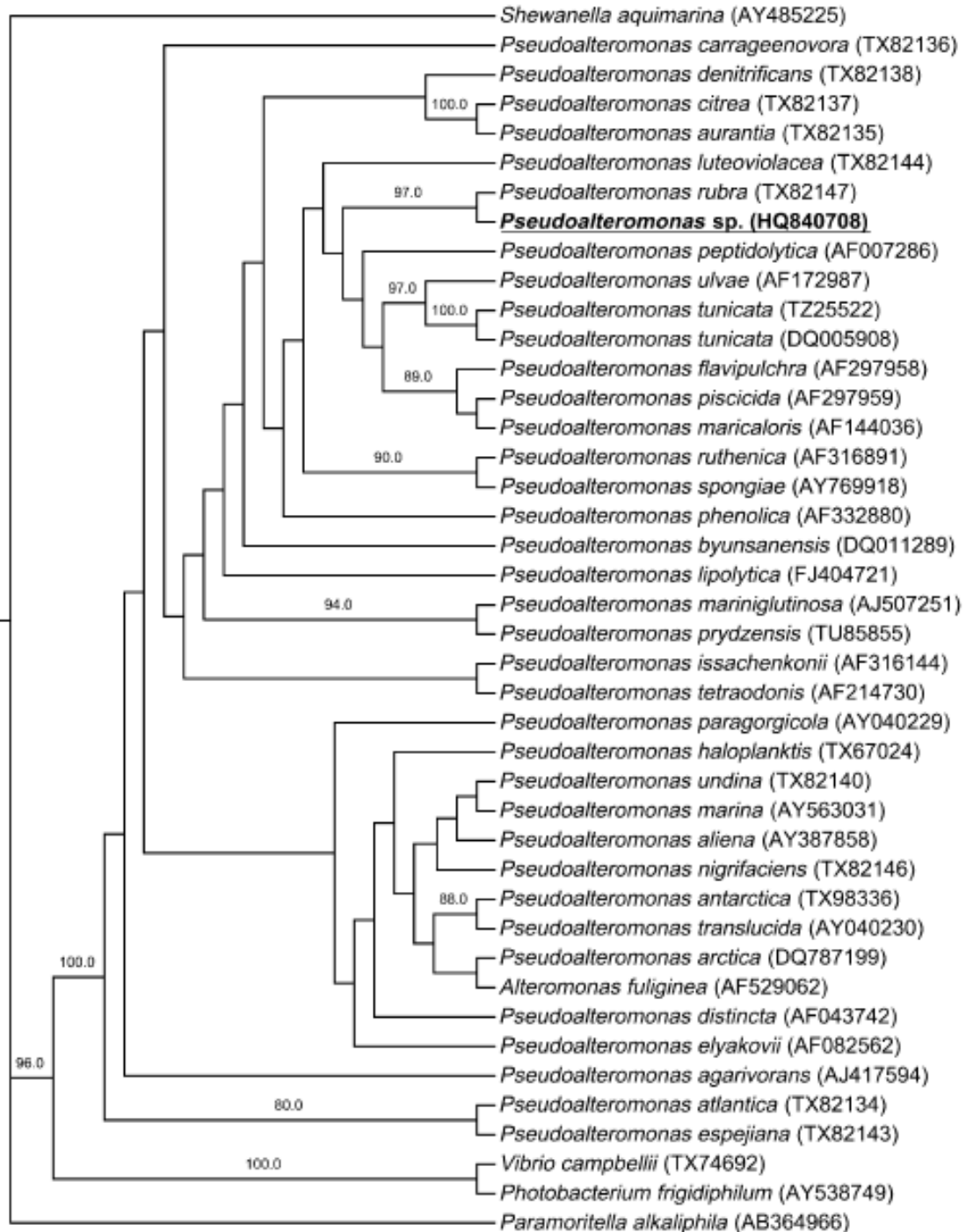


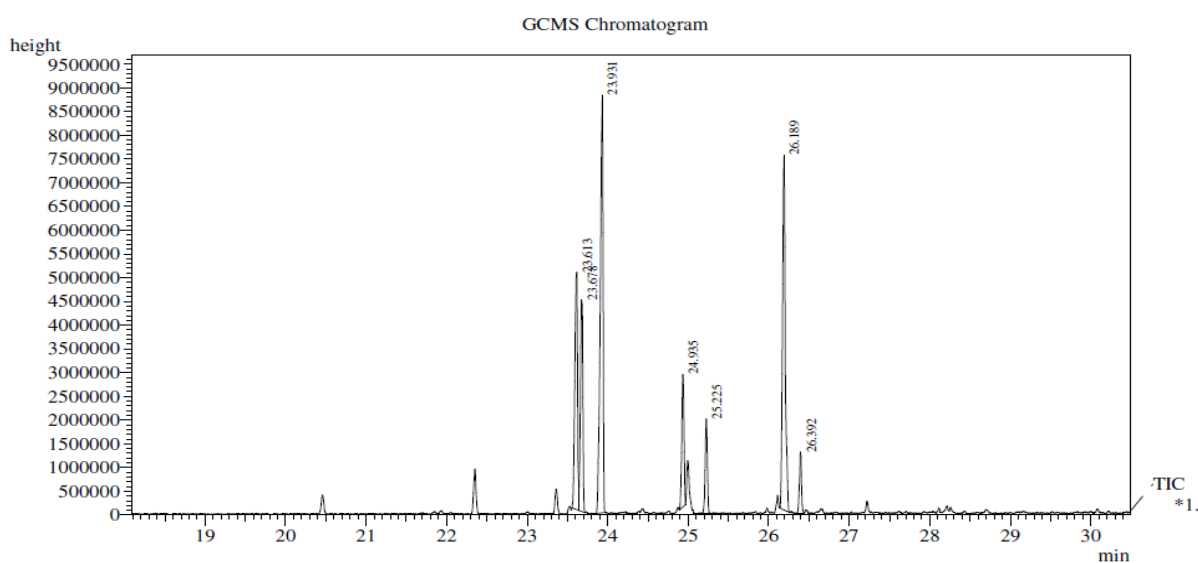
Figura 5: Árvore filogenética que mostra a localização da nova bactéria isolada (negrito) entre diferentes espécies de *Pseudoalteromonas*. O número de acesso GenBank para cada espécie de referência é mostrado entre parênteses.



4.1.1 Identificação dos ésteres metílicos

A fração F1, obtida por eluição com hexano e hexano/ AcOEt 4: 1, foi esterificada com metanol e ácido clorídrico (p. 145) e posteriormente submetida a análise direta por cromatografia em fase gasosa (CG) acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). Na Figura 6 é mostrado o cromatograma com os tempos de retenção dos ésteres metílicos identificados.

Figura 6: Cromatograma com os tempos de retenção dos ésteres metílicos identificados



Na Tabela 2 são mostrados os 7 ácidos graxos identificados na forma de seus ésteres metílicos, bem como o percentual de cada ácido na amostra analisada. Como pode ser observado, os ácidos hexadecanóico e 9-octadecénoico foram os constituintes majotitários.

Tabela 2: Ácidos graxos identificados no extrato de *Pseudoalteromonas* sp.

Ácidos graxos	Tempo de Retenção (min)	Percentual (%)
Ácido hexadecanóico	23,93	29,3
Ácido cis-9-hexadecénoico	23,61	16,6
Ácido trans-9-hexadecenóico	23,67	12,9
Ácido heptadecanóico	25,22	5,4
Ácido 9-heptadecénoico	24,93	7,5
Ácido octadecanóico	26,4	3,2
Ácido 9-octadecénoico	26,18	25,1

4.1.2 Determinação estrutural de P-1

O tratamento cromatográfico da fração F-3, obtida por eluição com Hex/ AcOET (2:3) do extrato acetato de etila de *Pseudoalteromonas* sp. (item 5.4.1, p. 144), permitiu o isolamento de 16,4 mg de um pigmento vermelho escuro denominado P-1.

O espectro de massas de alta resolução (Fig. 8, p. 64) exibiu o íon correspondente à molécula protonada $[M + H]^+$ em m/z 324,2059 (calculado m/z 324,2075) indicando a fórmula molecular $C_{20}H_{26}N_3O$, a qual apresenta dez graus de insaturação.

O espectro de RMN 1H [500 MHz, $CDCl_3$] (Fig. 9, p. 64), apresentou dois simpletos largos, um em δ_H 12,70 (s, H-1') e outro em 12,55 (s, H-1), correspondentes a dois grupos NH. Na região de hidrogênios ligados a anéis aromáticos e ligados a carbonos olefínicos foram observados seis sinais em δ_H 7,23 (sl, H-2), 6,94 (s, H-6'), 6,92 (sl, H-4), 6,67 (s, H-3''), 6,35 (sl, H-3) e 6,07 (s, H-3'), todos integrados para um hidrogênio. Foram observados ainda neste espectro sinais integrados para três hidrogênios, um em δ_H 3,99 (s), caracterizando uma metoxila e outro em δ_H 2,54 (sl, H-6''), referente a um grupo metila. Na região de proteção, foram observados sinais referentes a hidrogênios metilênicos em δ_H 2,39 (t, $J=10,0$ Hz, H-7''), 1,53 (m, H-8''), 1,31 (m, H-9'') e 1,26 (m, H-10'') e um sinal tripleto para uma metila terminal em δ_H 0,90 (t, $J= 6,5$ Hz, H-11'') evidenciando uma cadeia lateral C_5H_{11} .

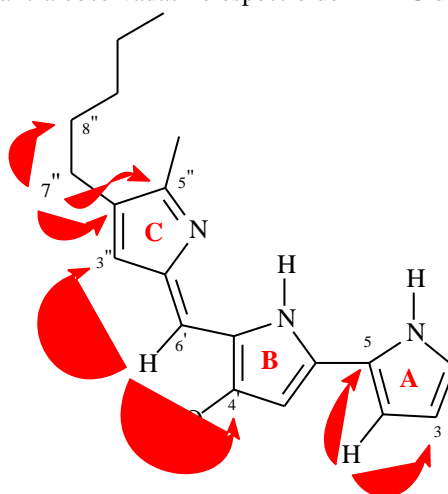
Através do experimento bidimensional de correlação homonuclear COSY (Fig. 10, p. 65) foi possível observar o acoplamento do hidrogênio em δ_H 6,35 (H-3) com os hidrogênios em δ_H 7,23 (H-2) e 6,92 (H-4) mostrando a relação vicinal entre eles. O espectro mostrou também o acoplamento entre os pares de hidrogênios em δ_H 2,39 (H-7'') e 1,53 (H-8''); 1,53 (H-8'') e 1,31 (H-9''); 1,26 (H-10'') e 0,90 (H-11''), confirmando a presença de uma cadeia lateral.

O espectro de RMN ^{13}C -CPD [125 MHz, $CDCl_3$] (Fig. 11, p. 65), exibiu 20 linhas espectrais. Através da combinação deste com o espectro bidimensional HSQC (Fig. 12, p. 66), foi possível verificar a presença de seis carbonos metínicos, quatro carbonos metilênicos, três carbonos metílicos, um dos quais é oxigenado (OCH₃) e sete carbonos não-hidrogenados, sendo o sinal em 166,0 (C-4) também oxigenado. Como mencionado anteriormente foram calculados, através da fórmula molecular, 10 graus de insaturações para P-1. Através da análise dos dados de RMN 1H e ^{13}C , bem como a presença de três átomos de nitrogênio indicados pela fórmula $C_{20}H_{26}N_3O$, foi possível inferir os graus de insaturação pela presença

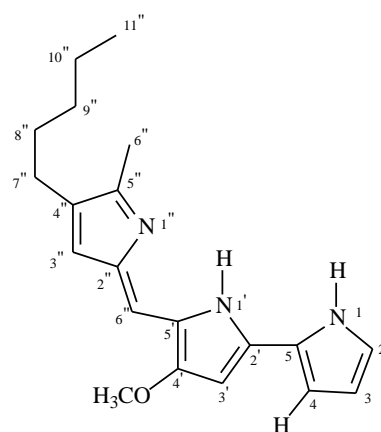
de três anéis pirrólicos, cada um contendo duas ligações duplas, e uma dupla ligação exocíclica.

Através da análise do espectro bidimensional HMBC (Fig. 13, p. 66) foi possível determinar com segurança as posições dos anéis pirrólicos, bem como a localização da cadeia lateral C_5H_{11} e dos grupos metila e metoxila observados no espectro de RMN 1H . O espectro exibiu correlações do hidrogênio em δ_H 6,94 (H-6') com os carbonos δ_C 128,6 (C-3'') e 166,0 (C-4') mostrando uma relação entre os anéis B e C. No anel A, foi possível observar a correlação do hidrogênio em δ_H 6,92 (H-4) com os carbonos metínicos δ_C 111,9 (C-3) e 122,5 (C-5). A posição da cadeia lateral no carbono 4'' foi justificada pela correlação do hidrogênio em δ_H 2,39 (2H-7'') com os carbonos δ_C 30,0 (C-8''), 128,6 (C-4'') e 147,2 (C-5''). Observou-se ainda correlações que justificaram a posição da metoxila e da metila nos carbonos C-4' e C-5'', respectivamente. A Figura 7 abaixo mostra as correlações relatadas acima.

Figura 7: Correlações a longa distância observadas no espectro de HMBC de P-1



A interpretação dos dados espectroscópicos de P-1 permitiu concluir que o metabólito secundário em discussão tratava-se da prodigiosina, um pigmento vermelho isolado pela primeira vez a partir de espécies de *Serratia* (WASSERMAN *et al.*, 1960). Este pigmento e os seus derivados têm sido isolado a partir de varias espécies de bactérias, incluindo *Pseudoalteromonas* spp. (LEWIS & CORPE, 1964; GERBER & GAUTHIER, 1979; KAWAUCHI *et al.*, 2007; BENNET *et al.*, 2000 e WILLIAMSON *et al.*, 2006). Na Tabela 3 (p. 63) são mostrados os dados espectrais de P-1, obtidos em $CDCl_3$, comparando-os com aqueles encontrados na literatura para a prodigiosina (VALENTE *et al.*, 2008).



Prodigiosina

Tabela 3: Deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C de P-1. Dados de RMN ^{13}C da prodigiosina (VALENTE *et al.*, 2008)

C	P-1 (CDCl_3)		Prodigiosina (CDCl_3)
	δ_{C}	δ_{H} (multip, $J_{\text{H,H}}$)	δ_{C}
1	-	12,5 (sl)	-
2	127,1	7,23 (sl)	127,1
3	111,9	6,35 (sl)	111,9
4	117,2	6,92 (sl)	117,2
5	122,4		122,5
1'	-	12,7 (sl)	-
2'	147,9		147,9
3'	93,0	6,07 (s)	93,0
4'	166,0		166,0
5'	120,9		120,9
6'	116,2	6,94 (s)	116,3
1''	-		-
2''	125,4		125,4
3''	128,6	6,67 (s)	128,6
4''	128,6		128,7
5''	147,2		147,3
6''	12,6	2,54 (sl)	12,7
7''	25,5	2,39 (t, $J= 10,0$ Hz)	25,6
8''	30,0	1,53 (m)	30,0
9''	31,6	1,29 (m)	31,6
10''	22,7	1,31 (m)	22,7
11''	14,2	0,90 (t, $J= 6,5$ Hz)	14,27
CH_3O	58,9	4,00 (s)	58,9

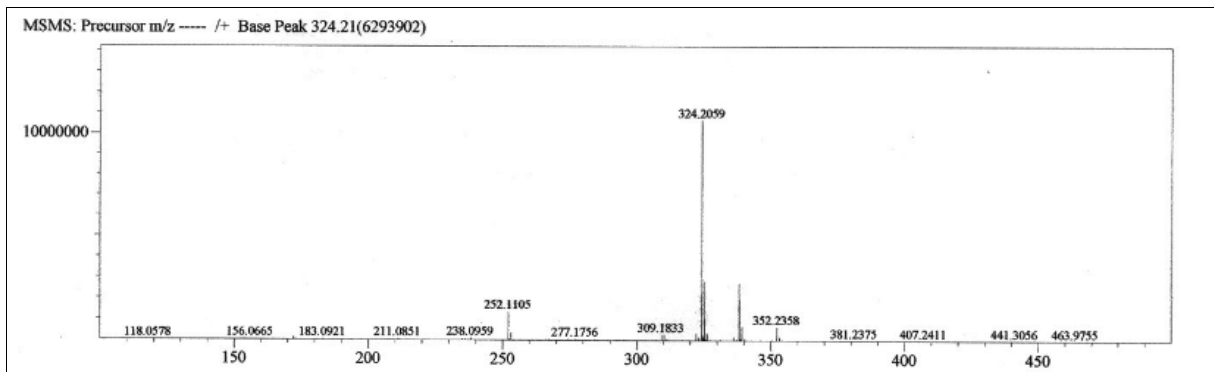
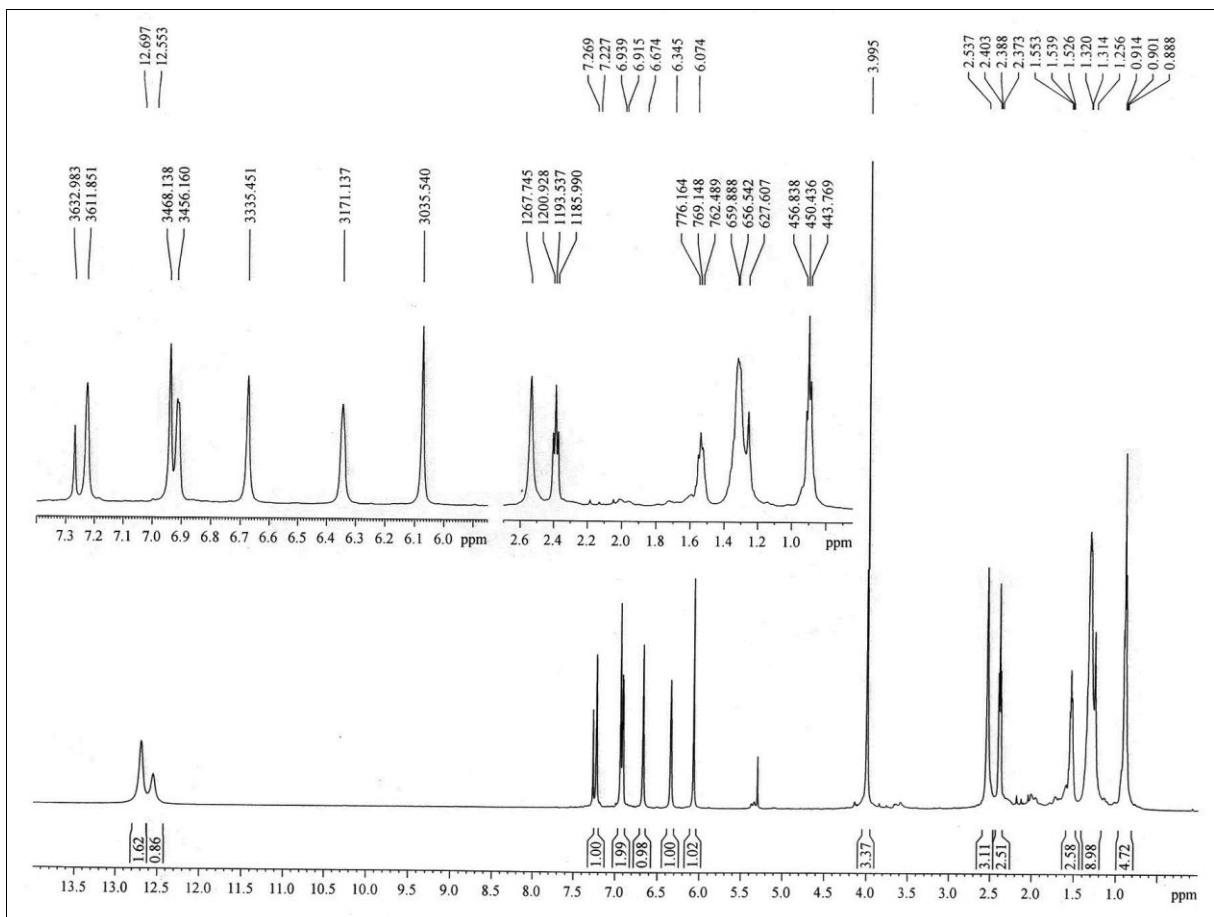
Figura 8: Espectro de massa de alta resolução de P-1**Figura 9:** Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de P-1

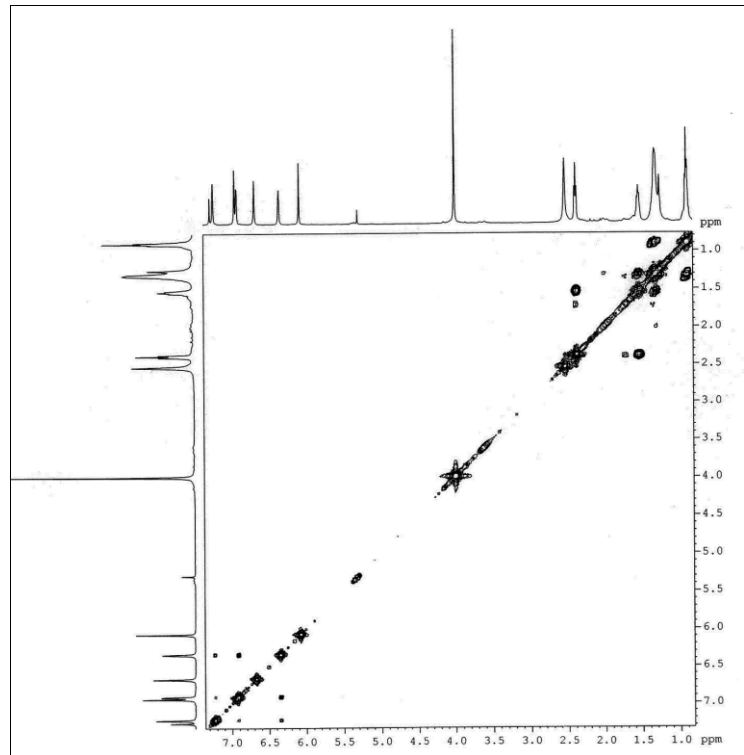
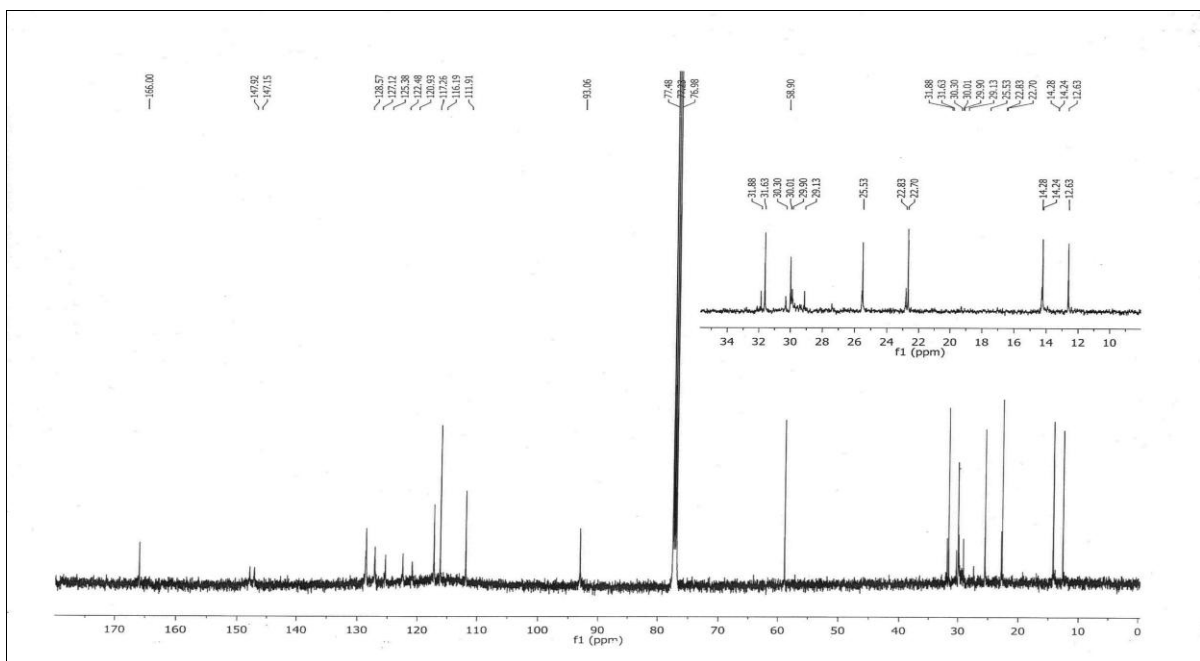
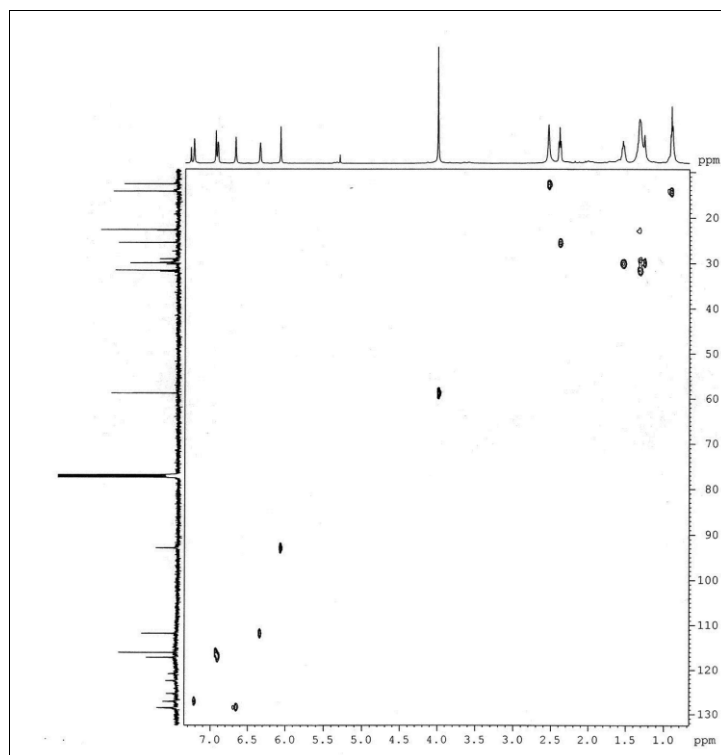
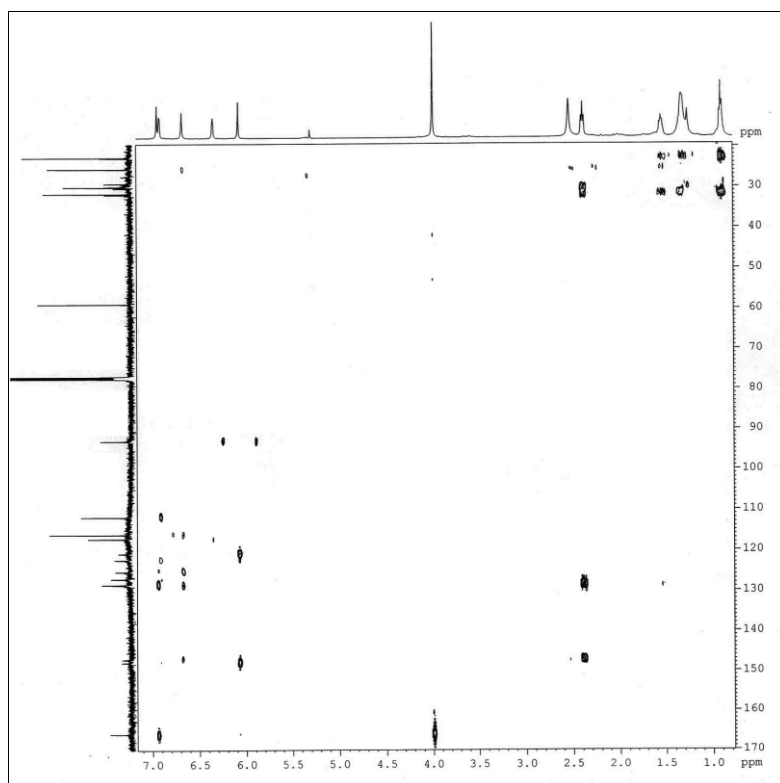
Figura 10: Espectro de RMN COSY (500 MHz, CDCl_3) de P-1**Figura 11:** Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de P-1

Figura 12: Espectro de RMN HSQC (125 MHz, CDCl_3) de P-1**Figura 13:** Espectro de RMN HMBC (125 MHz, CDCl_3) de P-1

4.1.3 Determinação estrutural de P-2

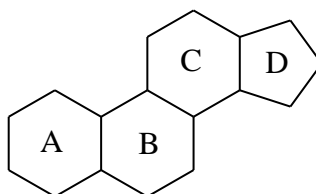
O fracionamento cromatográfico da fração F6, obtida por eluição com AcOEt a partir do extrato acetato de etila de *Pseudoalteromonas* sp. (item 5.4.1, p. 144), resultou no isolamento de 14,8 mg de um sólido branco denominado P-2.

O espectro de massa de alta resolução (Fig. 17, p. 70), obtido com ionização por *electrospray* e no modo positivo, mostrou picos em m/z 415,2904 $[M + Na]^+$ e 431,2616 $[M + K]^+$, correspondentes aos adutos de sódio e potássio, respectivamente, revelando a fórmula molecular $C_{24}H_{40}O_4$ (massa calculada 415,2824, com relação ao aduto de sódio). Corroborando com a fórmula molecular deduzida, o espectro de massa, obtido no modo negativo (Fig. 17, p. 70), exibiu o pico em m/z 391,2883, referente a molécula desprotonada $[M - H]^-$.

O espectro de RMN 1H [500 MHz, C_5D_5N] (Fig. 18, p. 70), mostrou sinais com integração para três hidrogênios em δ_H 0,75 (s, H-18); 0,96 (s, H-19) e 1,22 (d, $J = 6,25$ Hz, H-21), caracterizando grupos metilas. Exibiu também um conjunto de sinais na região entre δ_H 1,10 e 2,68, relativos a grupos metilênicos, assim como um simpleto em δ_H 4,21 (H-12) e um multiplete em δ_H 3,87 (H-3) relativos a hidrogênios ligados a carbono oxigenado.

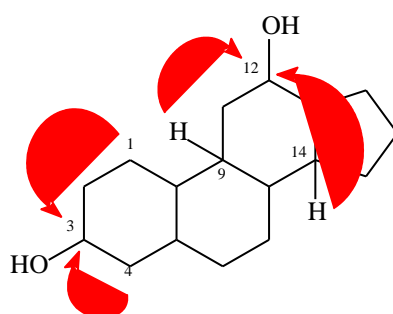
O espectro de RMN ^{13}C -CPD [125 MHz, C_5D_5N] (Fig. 19, p. 71), exibiu 24 linhas espectrais. Através da comparação com o espectro DEPT 135° (Fig. 20, p. 71) foi possível observar a presença de três carbonos metílicos, dez carbonos metilênicos, oito carbonos metínicos, sendo os sinais em δ_C 72,6 (C-12) e 71,6 (C-3) oxigenados e apenas três carbonos não-hidrogenados, onde o sinal em δ_C 178,0 foi compatível com uma carbonila de ácido. A análise dos dados de RMN 1H e ^{13}C , juntamente com a fórmula molecular fornecida pelo espectro de massa, evidenciaram um núcleo esteroidal (Fig. 14) para o metabólito P-2.

Figura 14: Núcleo comum aos esteroides: ciclopentanoperidrofenantreno



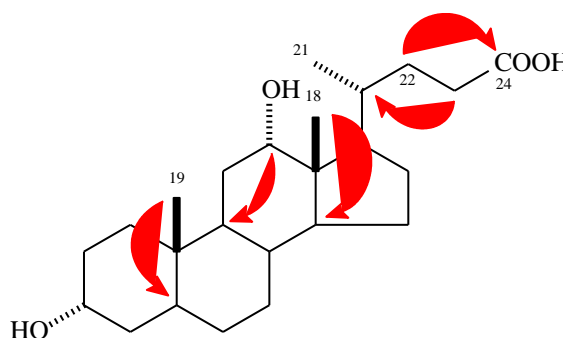
Através do espectro bidimensional HMBC (Fig. 21 e 22, p. 72) foi possível posicionar uma hidroxila no carbono C-3 pelas correlações dos hidrogênios metilênicos em δ_H 1,83/ 1,10 (2H-1) e em δ_H 2,32/2,21 (2H-4) com o carbono em δ_C 71,6 (C-3). Já a outra hidroxila foi posicionada no carbono C-12 pelas correlações dos hidrogênios metínicos em δ_H 2,21 (H-9) e 1,95 (H-14) com o carbono em 72,6 ppm, Figura 15.

Figura 15: Algumas correlações observadas no experimento HMBC para P-2



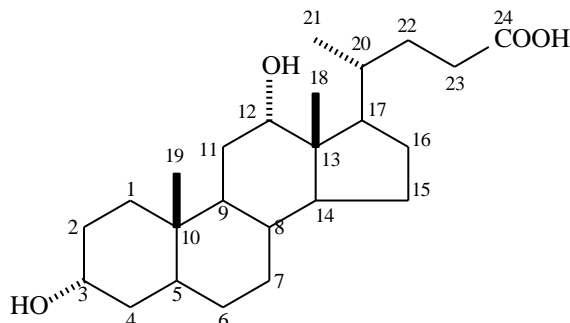
Outras correlações exibidas no espectro de HMBC foram importantes para determinar o posicionamento das metilas nos carbonos C-18, C-19 e C-21, bem como a posição do ácido carboxílico no carbono C-24, Figura 16.

Figura 16: Outras correlações observadas no espectro de HMBC de P-2



Os dados acima discutidos permitiram elucidar a estrutura de P-2 como sendo o ácido desoxicólico. Esse composto é um produto final do metabolismo do colesterol e é essencial na solubilização e transporte de lipídeos (HOFMANN and HAGEY, 2008), sendo encontrado predominantemente em mamíferos. Acredita-se que as bactérias não possuem via de biossíntese de colesterol para produzir ácidos biliares (MANEERAT *et al.*, 2004), contudo alguns trabalhos comprovam que algumas bactérias são capazes de produzir esses ácidos

quando cultivadas em meios contendo colesterol (PARK *et al.*, 1995; MANEERAT *et al.*, 2004 e LI *et al.*, 2009). A Tabela 4 mostra os dados de RMN de ^1H e ^{13}C e os compara com a literatura (LI *et al.*, 2009).



Ácido desoxicólico

Tabela 4: Deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C de P-2 e comparação com a literatura (LI *et al.*, 2009)

C	P-2 (C ₅ D ₅ N)		Ácido desoxicólico (CD ₃ OD)
	δ_{C}	δ_{H} (multip, $J_{\text{H,H}}$)	δ_{C}
1	36,3	1,83 (m) /1,10 (m)	36,4
2	28,4	1,96 (m) /1,39 (m)	28,6
3	71,6	3,87 (m)	72,5
4	37,7	2,32 (m) / 2,21 (m)	37,4
5	42,9	1,40 (m)	43,6
6	28,0	1,85 (m)/ 1,23 (m)	28,4
7	27,0	1,38 (m)/1,16 (m)	27,5
8	36,8	1,40 (m)	37,2
9	34,3	2,21 (m)	34,3
10	34,8	-	32,3
11	30,0	1,74 (m)/ 1,56 (m)	29,9
12	72,6	4,21 (sl)	74,0
13	47,7	-	48,1
14	48,8	1,95 (m)	49,3
15	24,5	1,59 (m)/ 1,15 (m)	24,9
16	31,7	1,88 (m)	31,1
17	47,3	2,28 (m)	47,5
18	13,4	0,75 (s)	13,2
19	23,9	0,96 (s)	23,7
20	36,4	1,56 (m)	36,7
21	17,8	1,22 (d, $J= 6.25$ Hz)	17,6
22	35,9	2,21 (m)/ 1,46 (m)	35,3
23	32,4	2,68 (m); 2,56 (m)	32,0
24	178,0	-	178,3

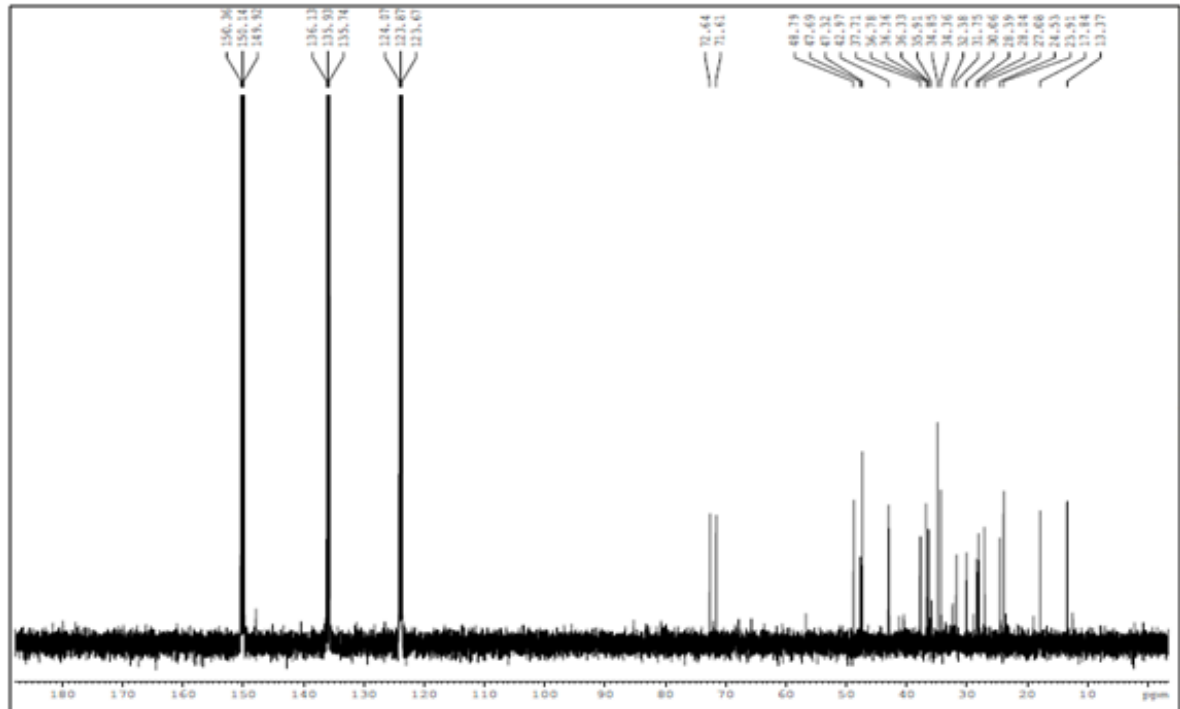
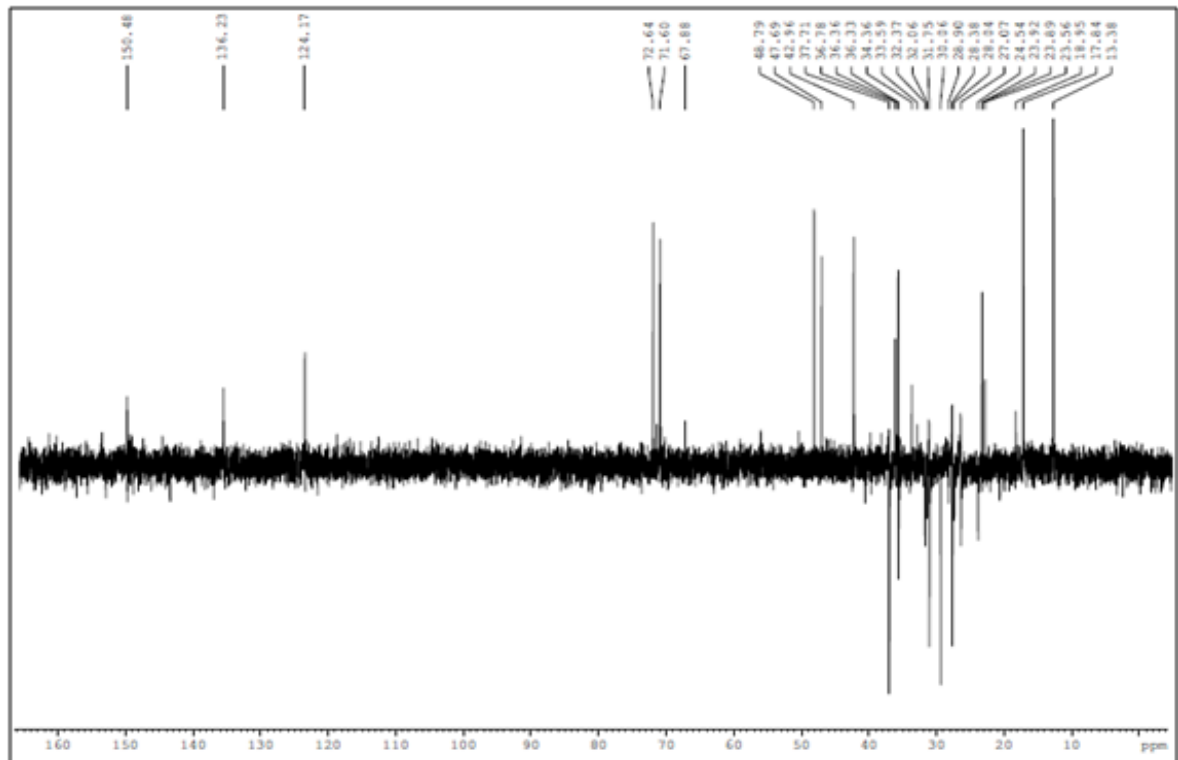
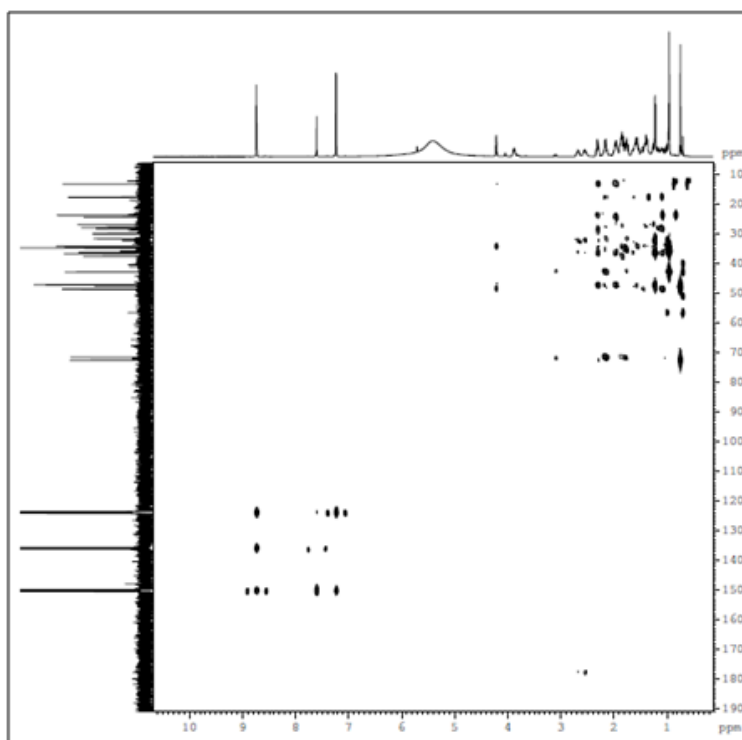
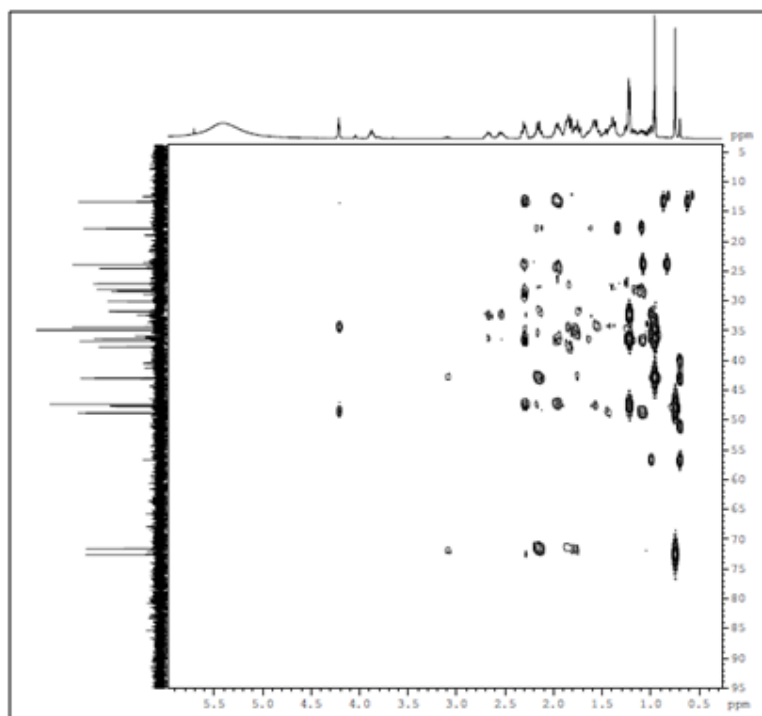
Figura 19: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de P-2**Figura 20:** Espectro de RMN DEPT 135° (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de P-2

Figura 21: Espectro de RMN HMBC (125 MHz, C₅D₅N) de P-2**Figura 22:** Expansão do espectro de RMN HMBC (125 MHz, C₅D₅N) de P-2

4.1.4 Determinação estrutural de P-3

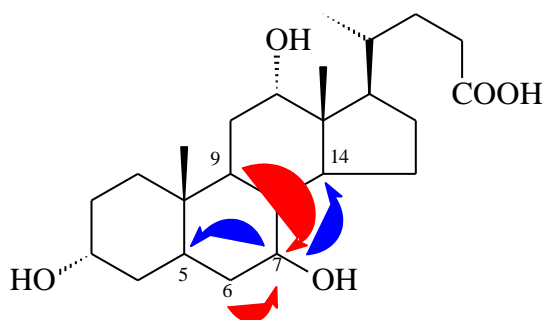
A fração F7, obtida pela eluição com AcOEt/MeOH (4: 1), foi submetida a cromatografia por exclusão molecular utilizando sephadex LH-20 resultando no isolamento de 13,6 mg de um sólido branco nomeado como P-3.

O espectro de massas de alta resolução (Fig. 24, p. 76) obtido com ionização *electrospray* e no modo positivo, mostrou um pico referente ao aduto de sódio $[M+Na]^+$ em m/z 431,2729 (calculada 431,2773) indicando a fórmula molecular $C_{24}H_{40}NaO_5$. Adicionalmente foi também observado um pico em m/z 447,2401 (calculada 447,2512) referente ao aduto de potássio da molécula $[M+K]^+$.

O espectro de RMN 1H [500 MHz, C_5D_5N] (Fig. 25, p. 76) do metabólito P-3 apresentou sinais semelhantes a P-2, sendo a única diferença observada foi a presença de um sinal adicional na região de hidrogênios ligados a carbono oxigenado, coerente com a fórmula molecular de P-3, que possui um oxigênio a mais que P-2. Os sinais observados para os hidrogênios oximetínicos foram: δ_H 4,25 (s, H-12), 4,09 (s, H-7) e 3,75 (m, H-3). Também foram observados sinais para três metilas em δ_H 1,23 (d, $J=5,5$ Hz, H-21), 1,00 (s, H-19) e 0,81 (s, H-18), além de sinais na região entre δ_H 1,37 e 3,17 referente a hidrogênios metilênicos e metínicos.

O espectro de RMN ^{13}C -CPD [125 MHz, C_5D_5N] (Fig. 26, p. 77) exibiu 24 linhas espectrais e a comparação com o espectro DEPT 135° (Fig. 27, p. 77) permitiu determinar o padrão de hidrogenação correspondente a cada carbono. Foram observados três carbonos metílicos, nove carbonos metilênicos, nove carbonos metínicos, sendo os sinais em δ_C 72,7 (C-12), 72,2 (C-3) e 68,0 (C-7) oxigenados, e três carbonos não hidrogenados, onde o sinal em δ_C 178,0 foi compatível com uma carbonila. Esses dados indicaram um esqueleto esteroidal semelhante ao de P-2.

A posição da hidroxila adicional foi determinada através do espectro bidimensional HMBC (Fig. 28, p. 78). Observou-se a correlação a três ligações do hidrogênio em 4,09 (H-7) com os carbonos C-14 (42,9) e C-5 (43,0) e dos hidrogênios em 2,92 (H-9) e 1,67 (H-6) com o carbono C-7 (68,0), como exemplificadas na Figura 23 (p.74). Essas correlações permitiram posicionar a hidroxila adicional no carbono C-7.

Figura 23: Correlações observadas no espectro de HMBC de P-3

De acordo com os dados espectrais discutidos acima, bem como a comparação com a literatura (Maneerat *et al*, 2004), a estrutura de P-3 foi estabelecida como sendo o ácido cólico. Na Tabela 5 (p. 75) são mostrados os dados espectrais de P-3 e comparados com a literatura.

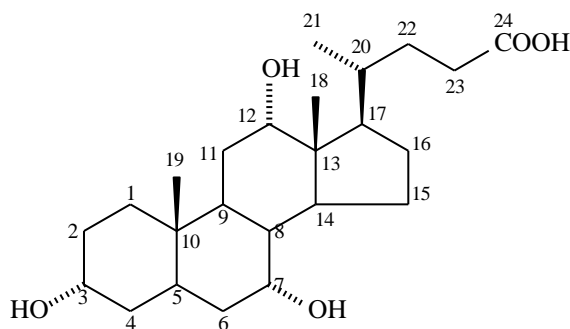
**Ácido cólico**

Tabela 5: Dados espectrais de P-3 e comparação com ácido cólico (MANEERAt *et al*, 2004)

C	P-3 (C ₅ D ₅ N)		Ácido cólico (CD ₃ OD)
	δ_C	δ_H (multip, $J_{H,H}$)	δ_C
1	36,4	1,93 (m) /1,04 (m)	36,5
2	32,0	1,93(m) /1,65 (m)	31,2
3	72,2	3,76 (m)	72,9
4	41,0	2,12 (m) / 1,65 (m)	40,5
5	43,0	1,50 (m)	43,2
6	36,2	1,68 (m)	35,9
7	68,0	4,09 (s)	69,1
8	41,4	3,11 (q, $J = 13,0$ Hz)	41,0
9	27,7	2,92 (dt, $J = 12,0$ e $4,2$ Hz)	27,9
10	35,7	-	35,9
11	30,0	1,87 (m)/ 1,65 (m)	29,6
12	72,7	4,25 (s)	74,0
13	47,3	-	47,5
14	42,9	2,76(m)	43,0
15	24,2	2,03 (m)/ 1,20 (m)	24,2
16	28,5	1,40 (m)	28,6
17	47,6	2,37 (m)	48,1
18	13,4	0,81 (s)	13,0
19	23,6	1,00 (s)	23,2
20	36,6	1,67 (m)	36,8
21	17,9	1,23 (d, $J= 5.5$ Hz)	17,6
22	32,4	2,14 (m)	32,3
23	32,3	2,65 (m); 2,53 (m)	32,0
24	178,0	-	178,2

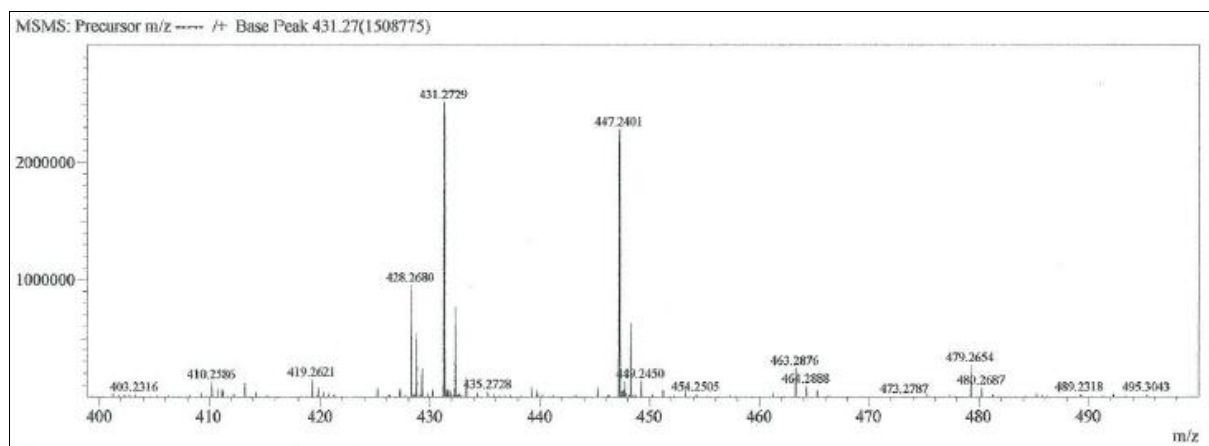
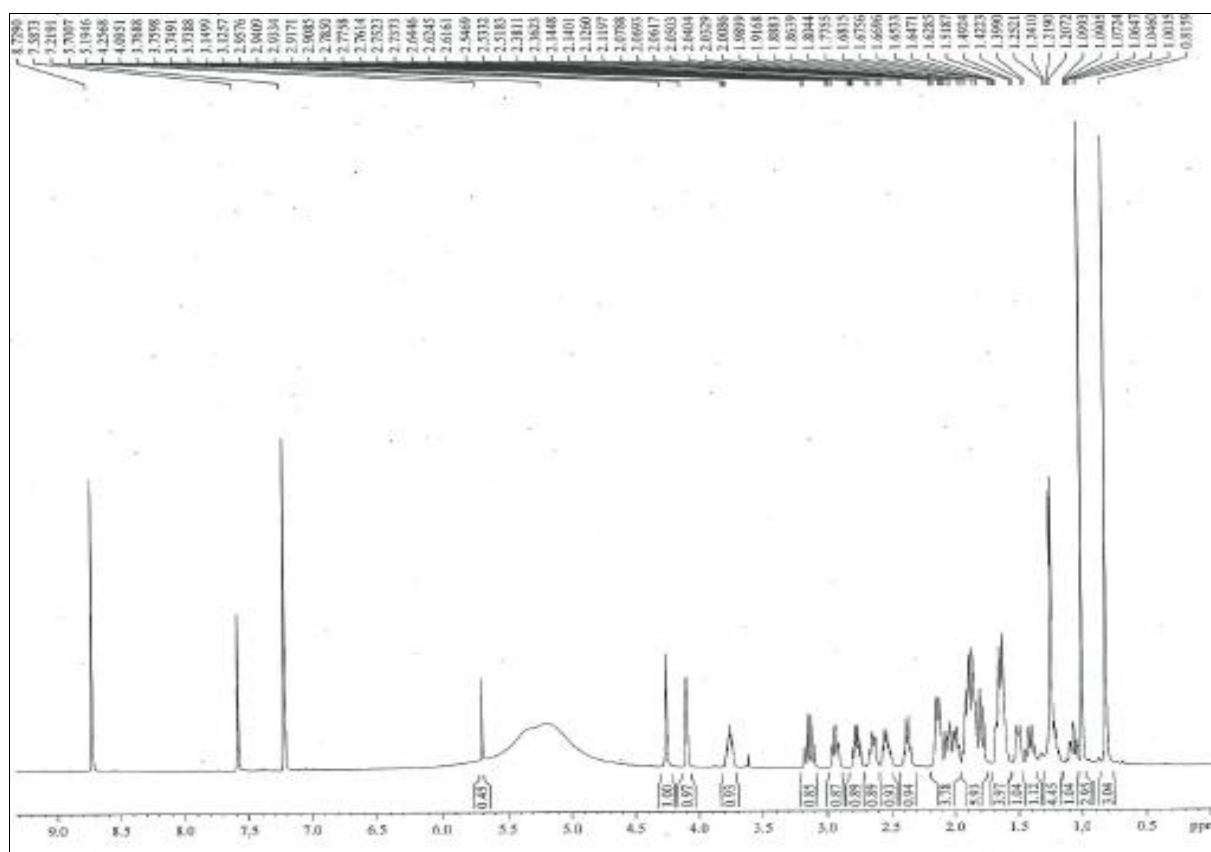
Figura 24: Espectro de massa de alta resolução no modo positivo de P-3**Figura 25:** Espectro e RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$) de P-3

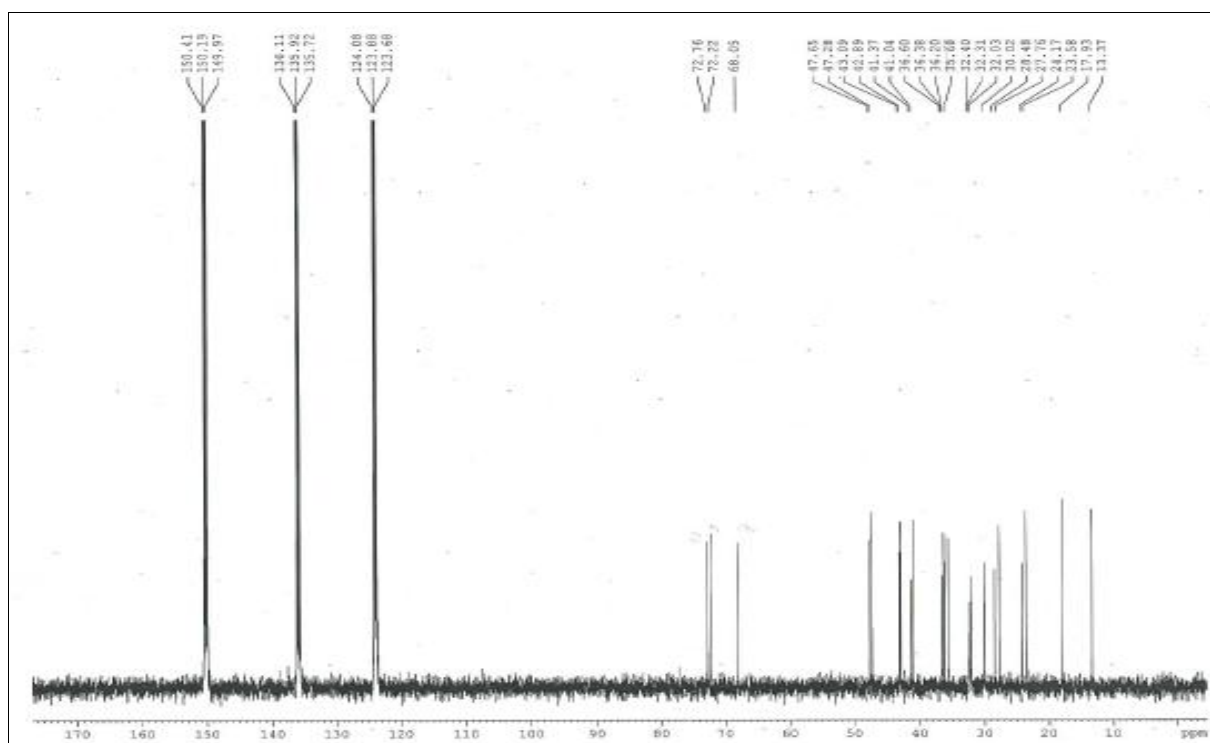
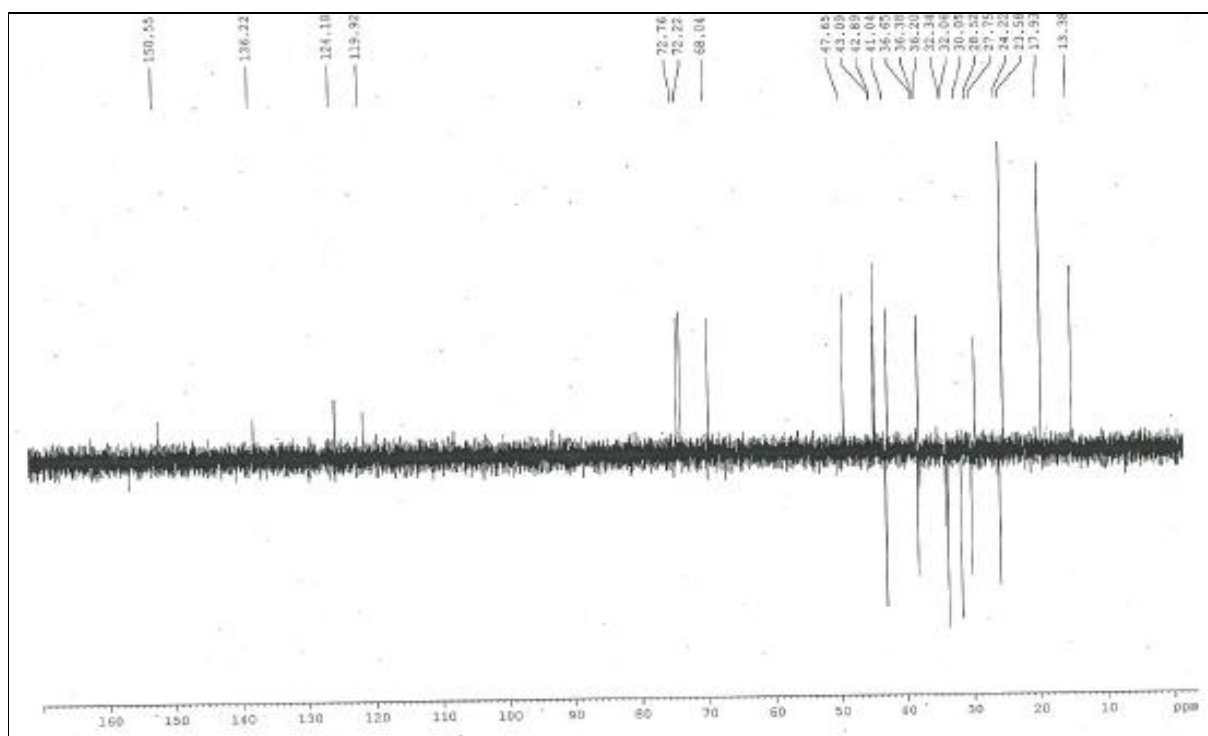
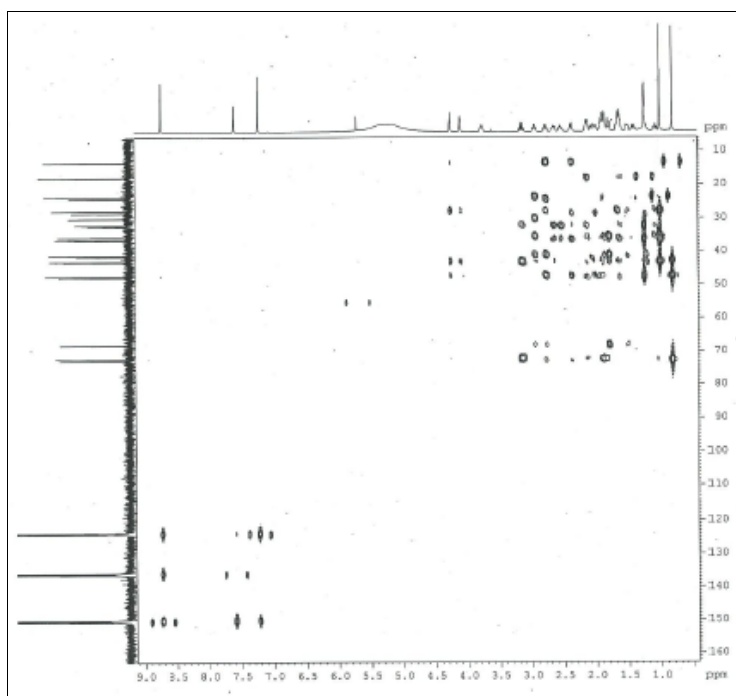
Figura 26: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$) de P-3**Figura 27:** Espectro de RMN DEPT 135° (125 MHz, $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$) de P-3

Figura 28: Espectro de RMN HMBC (125 MHz, C₅H₅N) de P-3

4.1.5 Atividade Biológica

O metabólito P-1, prodigiosina, foi submetido a ensaios citotóxicos frente as linhagens tumorais HCT-8 (cancêr de cólon), HL-60 (leucemia promielocítica), MDA-MB-435 (melanoma) e SF-295 (glioblastoma). Os metabólitos P-2 e P-3 não foram avaliados pois foram isolados de frações inativas. A literatura confirma essa inatividade ao mostrar valores de IC₅₀ superiores 10,81 µM para alguns ácidos biliares, entre eles o ácido desoxicólico (P-2), testado frente a várias células tumorais (LI *et al.*, 2009).

Na Tabela 6 abaixo, são apresentados os valores de IC₅₀ para o extrato bruto, para a fração ativa F3 e para a prodigiosina. A doxorrubicina foi utilizada como padrão positivo.

Tabela 6: Citotoxicidade de *Pseudoalteromonas* sp. (extrato bruto, fração F3 e prodigiosina).

Amostras	IC ₅₀ [µg/ml] CI 95%			
	HCT-8	HL-60	MDA-MB-435	SF-295
Extrato bruto	0,97	0,52	0,63	3,05
	0,77-1,22	0,36-0,75	0,54-0,74	1,92-4,85
Fração 3	0,08	0,01	0,05	0,01
	0,07-0,09	0,01-0,02	0,03-0,09	0,00-0,04
Prodigiosina	0,05	0,06	0,19	0,06
	0,04-0,06	0,04-0,08	0,12-0,31	0,04-0,08
Doxorrubicina	0,03	0,06	0,48	0,17
	0,03-0,05	0,04-0,09	0,35-0,65	0,13-0,23

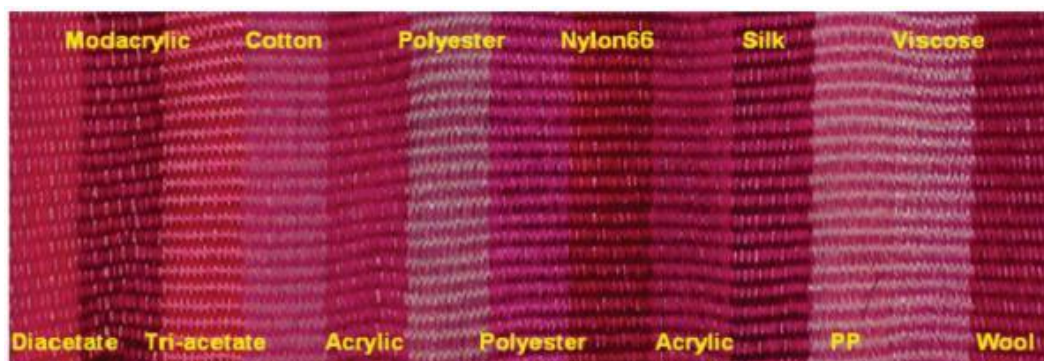
Os valores de IC₅₀ e os seus intervalos de confiança de 95% foram obtidos por regressão não linear utilizando o programa GraphPad (Intuitive Software for Science, San Diego, CA).

Observa-se que os valores de IC₅₀ encontrados para a prodigiosina são semelhantes ao padrão positivo e até melhores quando testados frente as linhagens MDA-MB-435 e SF-295. Este resultado já era esperado, uma vez que a prodigiosina e seus derivados têm um largo espectro de atividades. Além de exibirem atividade anti-tumoral estes compostos também apresentam propriedades imunossupressoras, antimalárica, antimicrobiana e proteção contra radiação ultravioleta (BULL *et al.*, 2000; CLIFT e THOMSON, 2009).

A atividade anticancerígena da prodigiosina e seus derivados foi descrita pela primeira vez em 2004, por Zacharski e Sukhatme. Em 2007, a prodigiosina e seus análogos foram testados por Pandeya e colaboradores contra células de cancro do pulmão, cérebro, rim, ovário, cólon, melanoma e leucemia, mostrando uma atividade melhor do que a doxorrubicina, que é resistente as células do carcinoma do pulmão e também expressa a proteína multirresistente a fármacos. Na base de dados do NCI (National Cancer Institute), a prodigiosina mostra um valor médio de IC₅₀ de 13,7 nM quando testado frente a 60 linhagens de células tumorais e valor de concentração letal médio - LC₅₀ de 2,1 μM (www.dtp.nci.nih.gov sob NSC 47147-F).

Devido a sua coloração vermelha, a prodigiosina também é relatada na literatura como corante textil, sendo utilizada na produção de tecidos antimicrobianos, Figura 29 (FURSTNER, 2003; ALIHOSSEINI *et al.*, 2008). Utilizar micro-organismos como produtores de biocorantes é mais vantajoso, quando comparados a corantes extraídos de plantas, visto que os micro-organismos apresentam um crescimento fácil em meios simples, disponibilidade durante todo o período do ano, elevada pureza e produzem menos resíduos (WILLIAMSON *et al.*, 2006).

Figura 29: Prodigiosina aplicada em diferentes tipos de tecidos



Outra informação importante é o valor comercial da prodigiosina, que custa aproximadamente R\$1400,00 reais o miligrama (<http://www.scbt.com/pt/datasheet-202298-prodigiosin.html>). Atualmente outros estudos de citotoxicidade estão sendo desenvolvidos com a prodigiosina pela aluna de doutorado da farmacologia Ana Jérsia Araújo.

4.2 *Micromonospora* sp.

O extrato ativo AcOEt produzido por *Micromonospora* sp. foi fracionado usando diferentes métodos cromatográficos como cromatografia gravitacional em gel de sílica, cromatografia “flash” e cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE, proporcionando o isolamento de quatro antraciclínonas (**M-1** a **M-4**).

4.2.1 Determinação estrutural de M-1

O tratamento cromatográfico da fração F-2 do extrato acetato de etila de *Micromonospora* sp. (item 5.4.2, p. 147), permitiu o isolamento de 4 mg de uma resina de cor vermelha denominada M-1.

O espectro de absorção na região do IV (Fig. 32, p. 85) apresentou uma absorção em 3368 cm^{-1} , típica de deformação axial de ligação O-H de alcoóis e/ou fenóis; absorções que apareceram como duas bandas em 1294 e 1271 cm^{-1} referentes à deformação axial de ligação C-O demonstrando o caráter oxigenado da molécula; forte absorção em 1675 cm^{-1} correspondente a deformação axial de ligação C=O conjugada, além de bandas em 1601 e 1589 cm^{-1} , compatíveis com deformação axial de C=C de aromáticos.

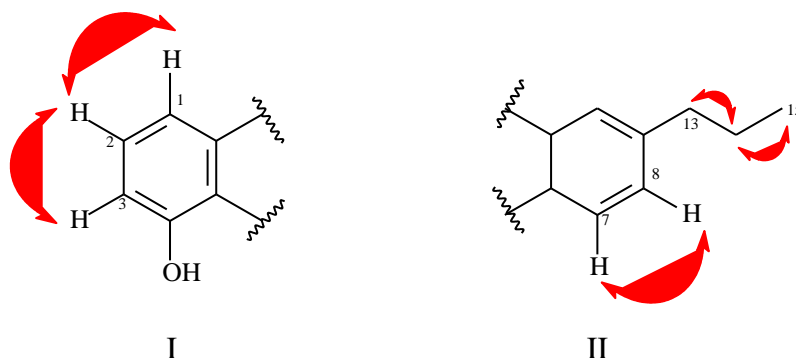
O espectro de massas de alta resolução (Fig. 33, p. 85) exibiu o íon correspondente à molécula protonada $[M + H]^+$ em m/z 349,1063 (calculado m/z 349,1076) referente à fórmula molecular $C_{21}H_{16}O_5$, a qual apresenta quatorze graus de insaturação.

O espectro de RMN 1H [500 MHz, $CDCl_3$] (Fig. 34, p. 86), apresentou sinais correspondentes a três grupos hidroxilas quelados em δ_H 15,44 (s), 14,32 (s) e 12,47 (s) e sinais na região de hidrogênios ligados a anéis aromáticos em δ_H 8,40 (d, $J = 8,3$ Hz, H-7), 8,29 (s, H-10) e 7,64 (dd, $J = 8,3$ e $1,4$ Hz, H-8) correspondentes a um sistema AMX. Observou-se ainda, na região de hidrogênios aromáticos, sinais em δ_H 7,95 (H-1), 7,71 (H-2) e 7,28 (H-3). A presença de um grupamento propila foi evidenciada pelo tripleto em δ_H 1,01 (3H-15) com integração para três hidrogênios, referente a um grupo metila, e pelos sinais em δ_H 1,79 (m, H-14) e 2,84 (t, $J = 7,5$ Hz, H-13), referentes a dois pares de prótons metilênicos.

O espectro de COSY (Fig. 35, p. 86) revelou acoplamento entre o hidrogênio ligado a anel aromático em δ_H 7,71 (H-2) com os hidrogênios em δ_H 7,95 (H-1) e 7,28 (H-3) como mostra a subestrutura I, na Figura 30 (p. 82). Na subestrutura II são mostrados os acoplamentos vicinais entre os hidrogênios aromáticos H-7 (δ_H 8,40,d, $J = 8,3$ Hz) e H-8 (δ_H

7,64, d, $J = 8,3$ Hz) bem como o acoplamento entre os hidrogênios metilênicos em δ_H 1,79 com os hidrogênios em δ_H 1,01 (H-15) e 2,84 (H-13), confirmando a presença do grupo propila.

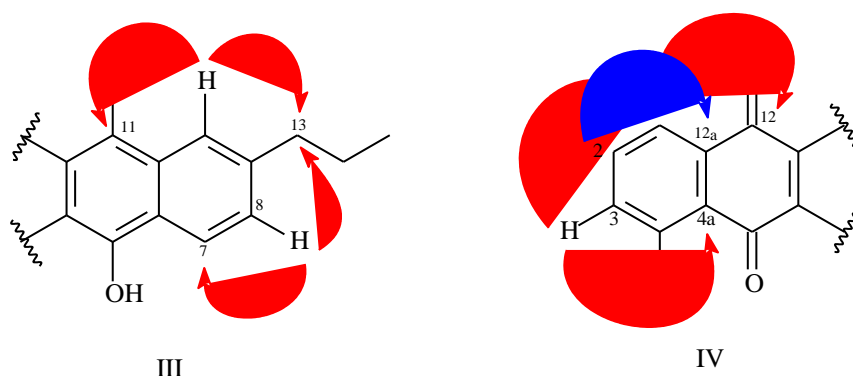
Figura 30: Acoplamento vicinais observados no espectro COSY de M -1



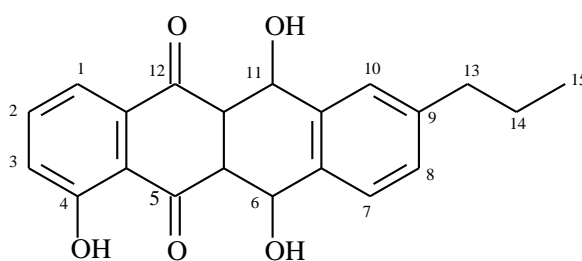
O espectro de RMN ^{13}C -CPD [125 MHz, CDCl_3] (Fig. 36, p. 87), apresentou 21 linhas espectrais cujo padrão de hidrogenação foi determinado pela comparação com o espectro DEPT 135° (Fig. 37, p. 87). Desta forma, verificou-se a presença de um carbono metílico em δ_C 14,1 (C-15), dois carbonos metilênicos em δ_C 38,4 (C-13) e 24,3 (C-14), seis carbonos metínicos em δ_C 118,9 (C-1); 136,3 (C-2); 123,5 (C-3); 125,4 (C-7); 132,8 (C-8); 124,5 (C-10) e doze carbonos não hidrogenados, sendo os sinais em 162,6 (C-4), 160,4 (C-6) e 161,9 (C-11), referentes a carbonos sp^2 oxigenados, enquanto os sinais em δ_C 185,5 (C-5) e 183,6 (C-12) foram inferidos a carbonilas de cetona conjugadas, caracterizando um núcleo antraquinônico.

O experimento HSQC (Fig. 38, p. 88) foi essencial para correlacionar seguramente todos os sinais de hidrogênio aos seus respectivos átomos de carbonos, inclusive distinguir entre os sinais dos hidrogênios metilênicos.

A análise do espectro HMBC (Fig. 39, p. 88), possibilitou determinar com segurança a posição do grupamento n-propila no carbono C-9 através das correlações a três ligações entre o hidrogênio δ_H 8,29 (H-10) com os carbonos em δ_C 161,9 (C-11) e em δ_C 38,4 (C-13), e através da correlação do hidrogênio em δ_H 7,64 (H-8) com o carbono C-13, como mostrados na subestrutura III (Fig. 31, p. 83). Ainda neste experimento foi possível observar as correlações a três ligações do hidrogênio H-3 (δ_H 7,28) com os carbonos C-4a (δ_C 119,2) e C-1 (δ_C 118,9); correlações do hidrogênio H-2 (δ_H 7,71) com o carbono C-12a (δ_C 134,4) e correlações do hidrogênio H-1 (δ_H 7,95) com carbono carbonílico C-12 (δ_C 183,6). Estas correlações são exibidas na subestrutura IV (Fig. 31, pág 83) e confirmam a estrutura proposta.

Figura 31: Acoplamento a longa distância (HMBC) de M -1

A interpretação dos dados espectroscópicos de M-1 permitiu concluir que o metabólito secundário em discussão tratava-se de uma antraciclina denominada como 4,6,11-triidroxi 9-propiltetraceno-5,12-diona, cuja estrutura foi relatada pela primeira vez pelo nosso grupo de pesquisa através do trabalho Anthracyclinones from *Micromonospora* sp., publicado no *Journal of Natural Products*, no ano de 2012 (SOUSA *et al*, 2012). A Tabela 7 (p. 84) mostra os deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C para M-1.



4, 6,11-triidroxi-9-propiltetraceno-5,12-diona

Tabela 7: Dados de RMN ^1H e ^{13}C (CDCl_3) de M-1

C	HSQC	
	δ_{C}	δ_{H} (multip, $J_{\text{H,H}}$)
1	118,9	7,95 (dd, $J= 8,1$ e $0,8$ Hz)
2	136,3	7,71 (t, $J= 8,1$ Hz)
3	123,5	7,28 (dd, $J= 8,1$ e $0,8$ Hz)
4	162,6	
4a	119,2	
5	185,5	
5a	106,5	
6	160,4	
6a	128,1	
7	125,4	8,40 (d, $J= 8,3$ Hz)
8	132,8	7,64 (dd, $J= 8,3$ e $1,4$ Hz)
9	147,6	
10	124,5	8,29 (s)
10a	131,0	
11	161,9	
11a	117,3	
12	183,6	
12a	134,4	
13	38,4	2,84 (t, $J= 7,5$ Hz)
14	24,3	1,79 (m)
15	14,1	1,01 (t, $J= 7,3$ Hz)
4-OH		12,47 (s)
6-OH		14,32 (s)
11-OH		15,44 (s)

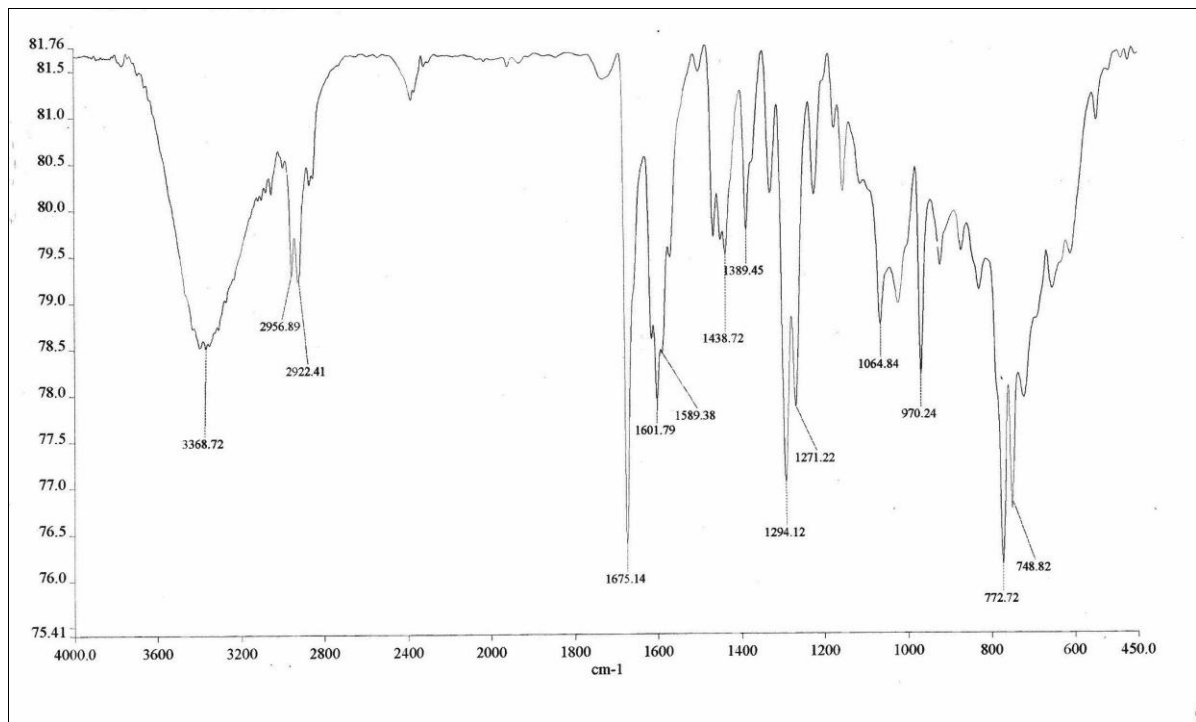
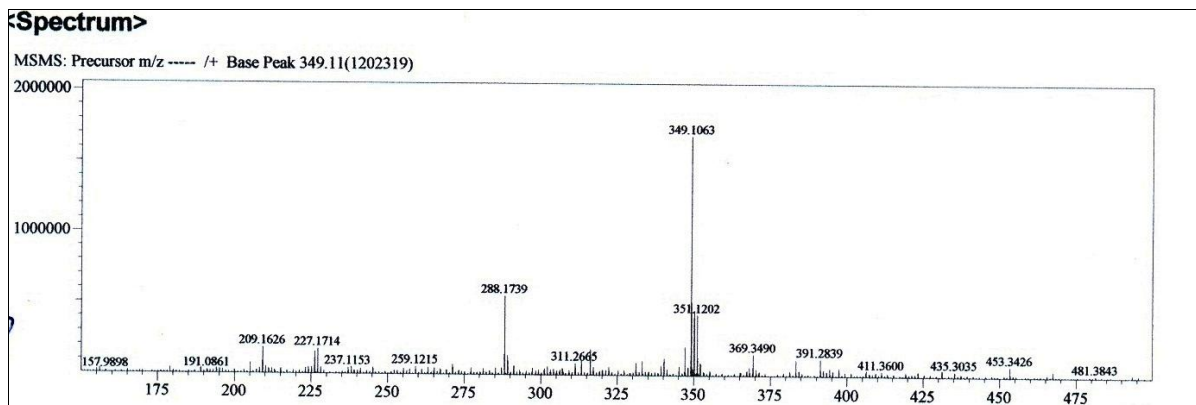
Figura 32: Espectro de absorção na região do infravermelho de M-1**Figura 33:** Espectro de massa de alta resolução do metabólito M-1

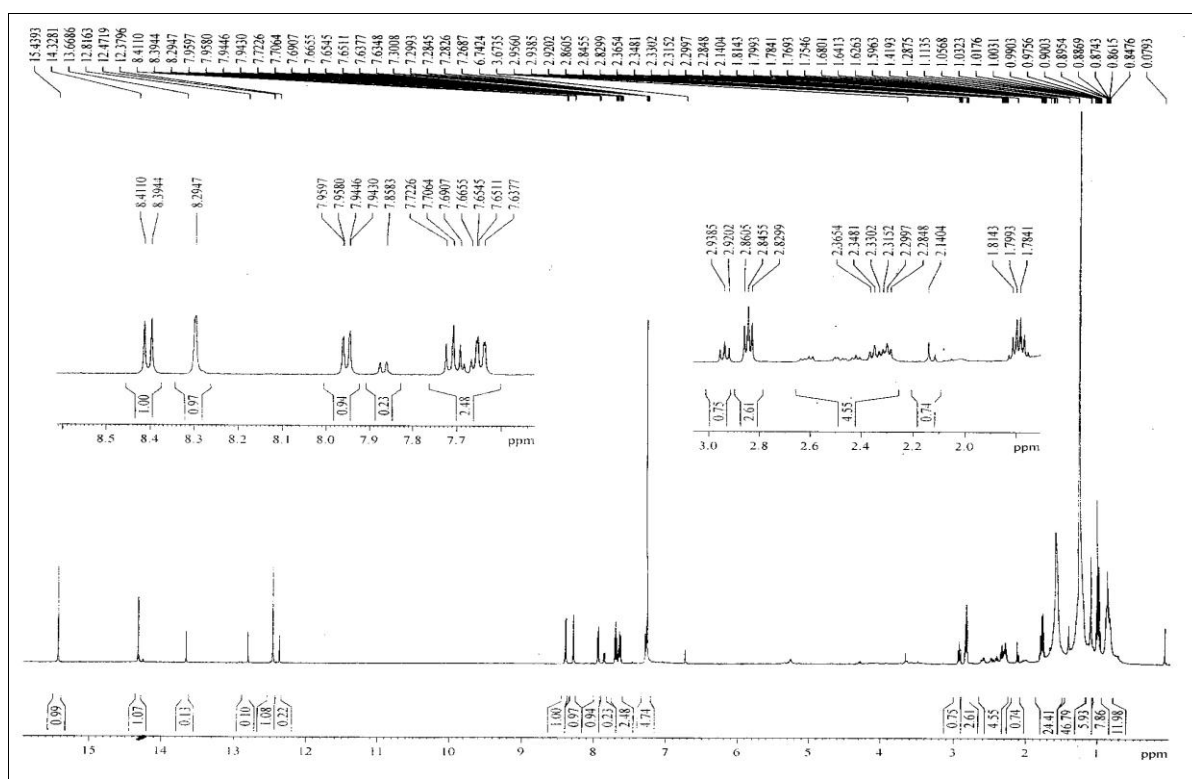
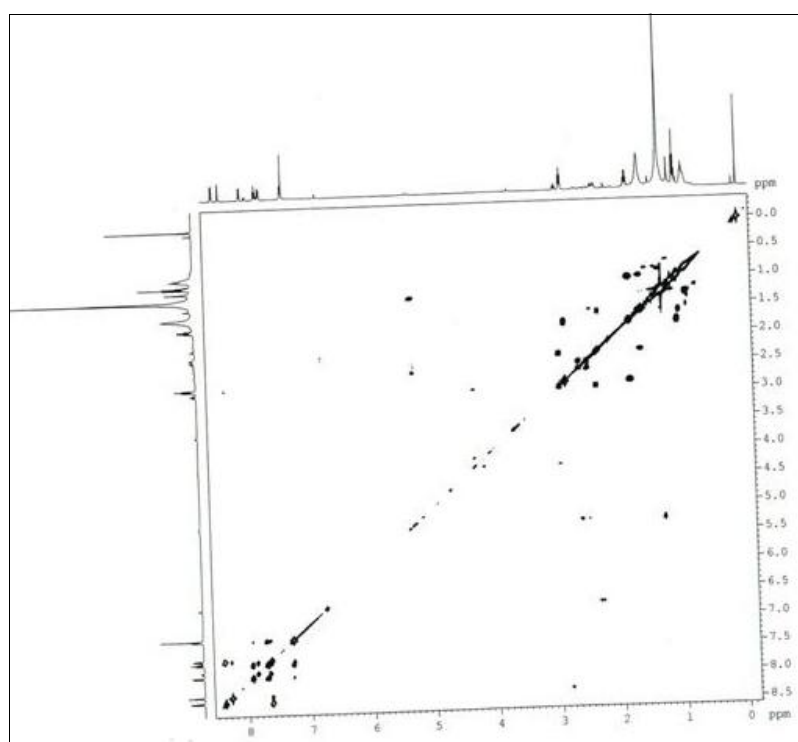
Figura 34: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de M-1**Figura 35:** Espectro de RMN COSY (500 MHz, CDCl_3) de M-1

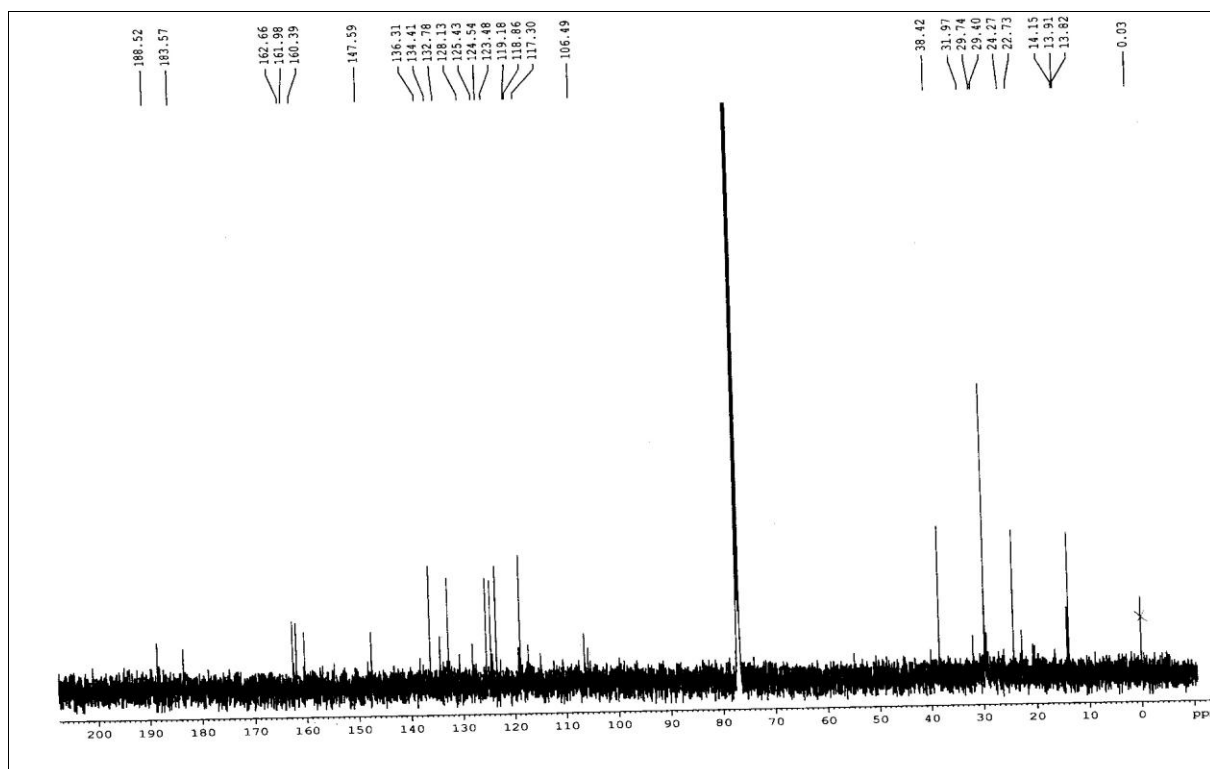
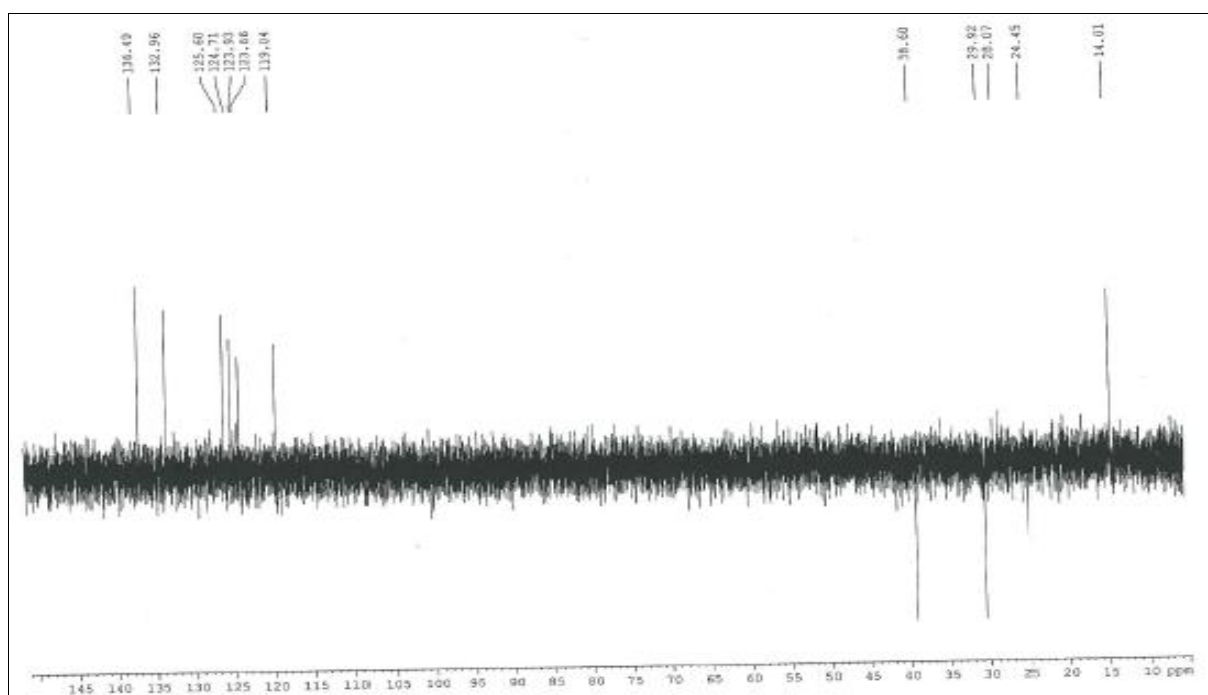
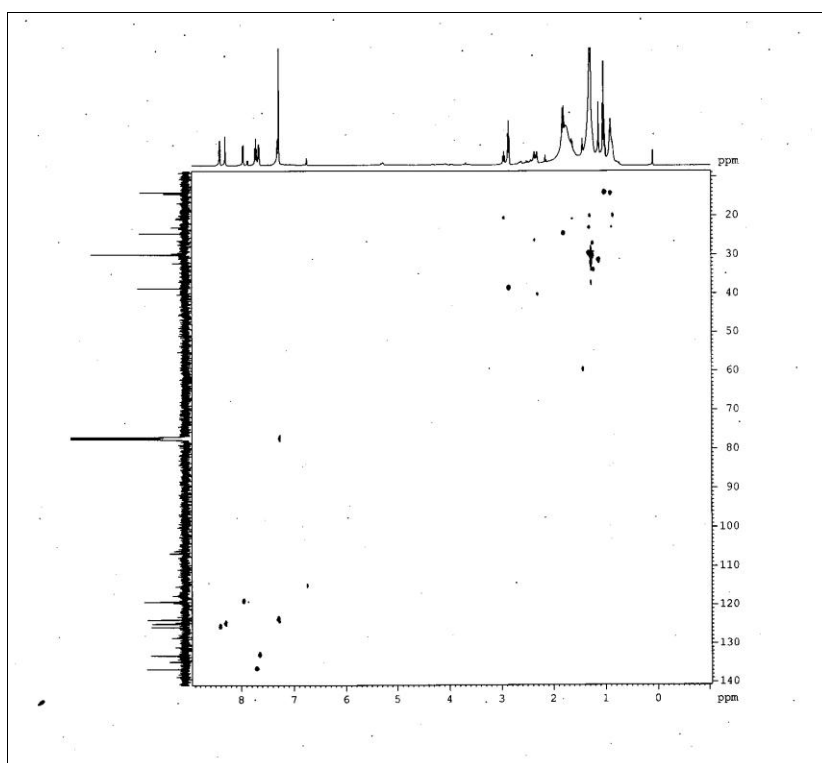
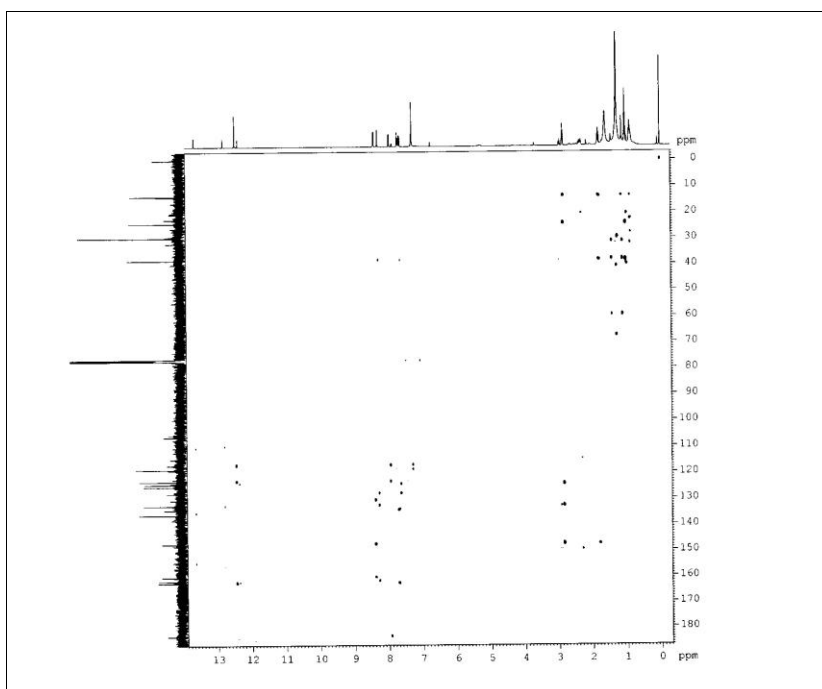
Figura 36: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de M-1**Figura 37:** Espectro de RMN DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) de M-1

Figura 38: Espectro de RMN HSQC (125 MHz, CDCl_3) de M-1**Figura 39:** Espectro de RMN HMBC (125 MHz, CDCl_3) de M-1

4.2.2 Determinação estrutural de M-2

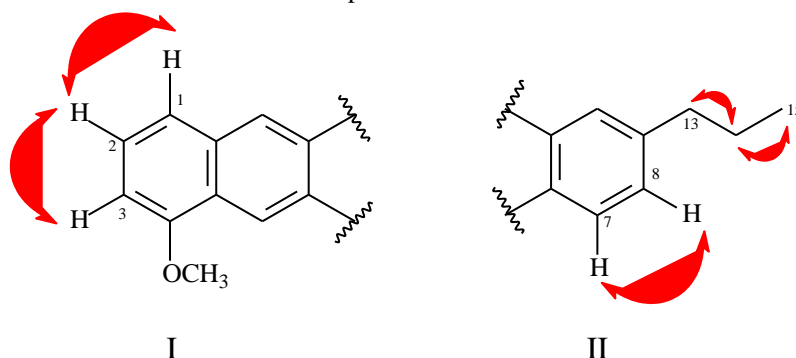
A fração F26-30, obtida da eluição com hexano/CH₂Cl₂ 1:1 a partir da fração F-2, foi cromatografada por CLAE (item 5.4.2, p. 149) para fornecer 5,9 mg de um sólido amarelo, com ponto de fusão na faixa de 192,3-192,7°C, codificado como M-2.

O espectro de absorção na região do IV (Fig. 42, p. 93) mostrou absorções em 2958, 2928 e 2869 cm⁻¹ características de deformação axial de ligação C-H de grupamentos metílico e metilênico; uma absorção em 1675 cm⁻¹ relativa à deformação axial de ligação C=O, evidenciando a existência de carboníla de cetona conjugada, bandas em 1617, 1602 e 1589 cm⁻¹ característica de deformação axial de C=C, além de absorção em 1291 cm⁻¹ para ligação C-O-C.

O espectro de massas de alta resolução de M-2 (Fig. 43, p. 93), apresentou o pico do íon molecular correspondente à molécula protonada [M + H]⁺ em *m/z* 331,1345 (calculado *m/z* 331,1334) condizente com a fórmula molecular C₂₂H₁₈O₃, a qual apresenta catorze graus de insaturação.

No espectro de RMN ¹H [500 MHz, CDCl₃] (Fig. 44, p. 94), foram observados sinais para dois hidrogênios em posição *peri* à carbonila em δ_H 9,27 (H-5) e 8,77 (H-12) e sinais típicos para dois sistemas de acoplamento AMX, sendo o primeiro em δ_H 7,60 (H-2), 6,99 (H-3) e 7,65 (H-1), e o segundo em δ_H 8,32 (H-7), 7,58 (H-8) e 8,19 (H-10), caracterizando um esqueleto antraquinônico distinto de M-1. Em δ_H 4,07 foi observado um simpleto, com integração para três hidrogênios, característico de um grupo metoxila ligado a anel aromático, enquanto na região de hidrogênios alifáticos foram observados sinais para um grupo *n*-propila, também presente em M-1.

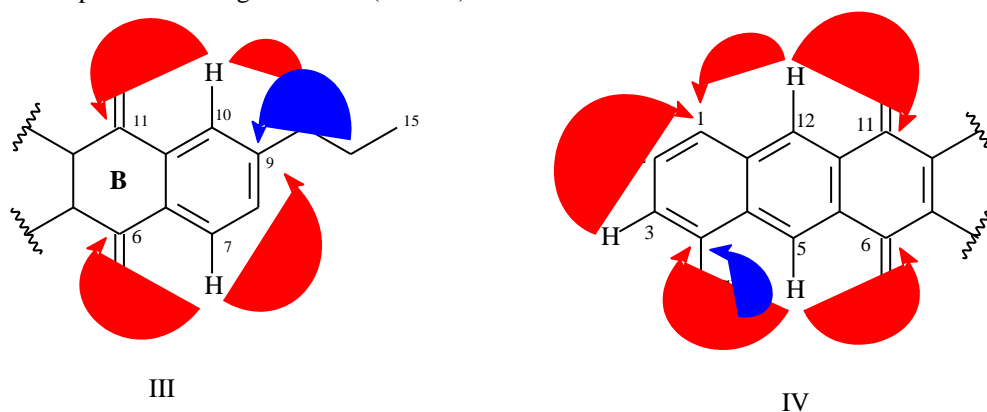
Através da interpretação do espectro COSY (Fig. 45, p. 94) e também com base nos valores das constantes de acoplamento foi possível construir as subestruturas I e II (Figura 40). Essas subestruturas mostram os acoplamentos entre os hidrogênios vicinais presentes em M-2. Este experimento também foi importante para atribuições inequívocas dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênios.

Figura 40: Acoplamento viciniais observados no espectro COSY de M -2

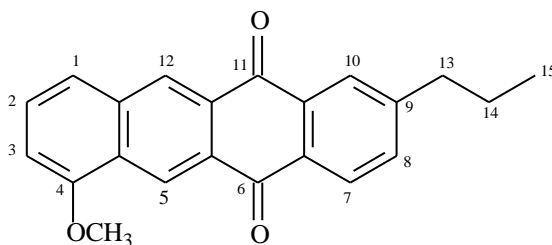
O espectro de RMN ^{13}C -CPD [125 MHz, CDCl_3] (Fig. 46, p. 95), apresentou sinais correspondentes a vinte e dois átomos de carbono. O padrão de hidrogenação foi determinado pela comparação entre os espectros de RMN ^{13}C e DEPT 135° (Fig. 47, p. 95) que revelaram a presença de dois carbonos metílicos, sendo o sinal em δ_{C} 56,0 referente a uma metoxila, dois carbonos metilênicos, oito carbonos metínicos aromáticos e dez carbonos não-hidrogenados, sendo o sinal em δ_{C} 157,4 (C-4) relativo a um carbono aromático oxigenado, enquanto os sinais em δ_{C} 182,9 (C-6) e 183,7 (C-11) foram inferidos a carbonilas de cetona de um núcleo quinônico.

O espectro bidimensional HSQC (Fig. 48, p. 96) possibilitou correlacionar os sinais de hidrogênios a seus respectivos sinais de carbonos, inclusive dos carbonos metilênicos.

O experimento HMBC (Fig. 49, p. 96), confirmou a posição dos carbonos carbonílicos no anel B, bem como a posição do grupamento n-propil no carbono C-9, através da correlação a três ligações entre o hidrogênio H-10 (δ_{H} 8,19) com os carbonos C-11 (δ_{C} 183,7) e C-13 (38,4) e entre o hidrogênio H-7 (δ_{H} 8,32) com os carbonos C-6 (182,9) e C-9 (δ_{C} 150,0), como mostrado na subestrutura III (Fig. 41, p. 91). A posição do grupo metoxila foi definida através da correlação a três ligações do sinal de hidrogênio em δ_{H} 4,07 com o carbono C-4 (δ_{C} 157,4). A subestrutura IV (Fig. 41, p. 91) demonstra as correlações apresentadas pelos hidrogênios em posição *peri* às carbonilas H-5 (δ_{H} 9,27) e H-12 (δ_{H} 8,77) e outras correlações importantes.

Figura 41: Acoplamento a longa distância (HMBC) de M -2

De acordo com os dados espectroscópicos apresentados chegou-se a conclusão de que M-2 tratava-se de um derivado antraciclínico de estrutura semelhante a M-1, mas com o núcleo 1,4-quinônico localizado no anel C. A estrutura de M-2 foi estabelecida como 4-metoxi-9-propiltetraceno-6,11-diona, sendo relatada recentemente na literatura pelo nosso grupo de pesquisa (SOUSA *et al.*, 2012). A Tabela 8 (p. 92) apresenta os deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C para M-2.



4-Metoxi-9-propiltetraceno-6,11-diona

Tabela 8: Dados de RMN ^1H e ^{13}C (CDCl_3) de M-2

C	HSQC	
	δ_{C}	δ_{H} (multip, $J_{\text{H,H}}$)
1	122,1	7,65 (m)
2	130,1	7,60 (t, $J = 7,6$ Hz)
3	107,3	6,99 (d, $J = 7,6$ Hz)
4	157,4	
4a	127,7	
5	124,6	9,27 (s)
5a	129,3	
6	182,9	
6a	132,9	
7	127,9	8,32 (d, $J = 8,0$ Hz)
8	134,7	7,58 (d, $J = 8,0$ Hz)
9	150,0	
10	127,3	8,19 (sl)
10a	134,6	
11	183,7	
11a	130,6	
12	129,0	8,77 (s)
12a	136,4	
13	38,4	2,79 (t, $J = 7,5$ Hz)
14	24,3	1,75 (q, $J = 7,5$ Hz)
15	13,9	1,00 (t, $J = 7,5$ Hz)
4-OCH ₃	56,0	4,07 (s)

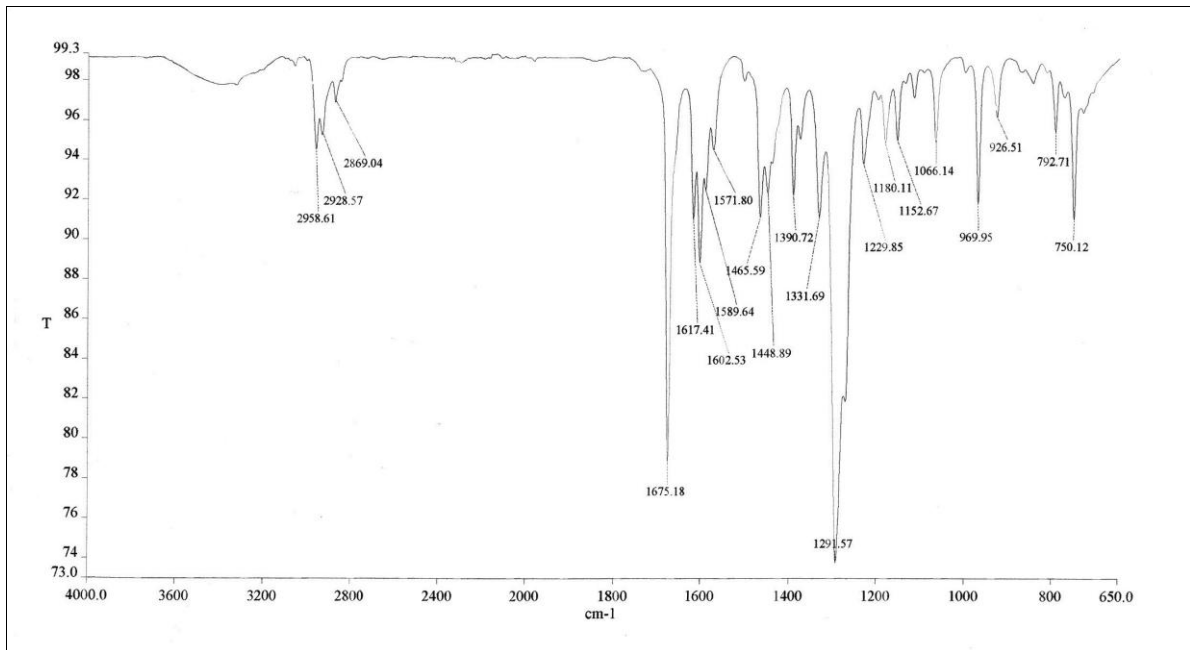
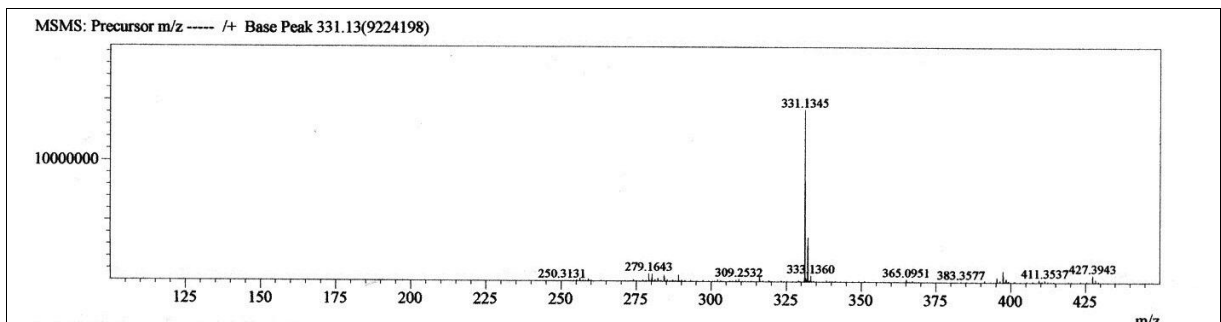
Figura 42: Espectro de absorção na região do infravermelho de M-2**Figura 43:** Espectro de massa de alta resolução de M-2

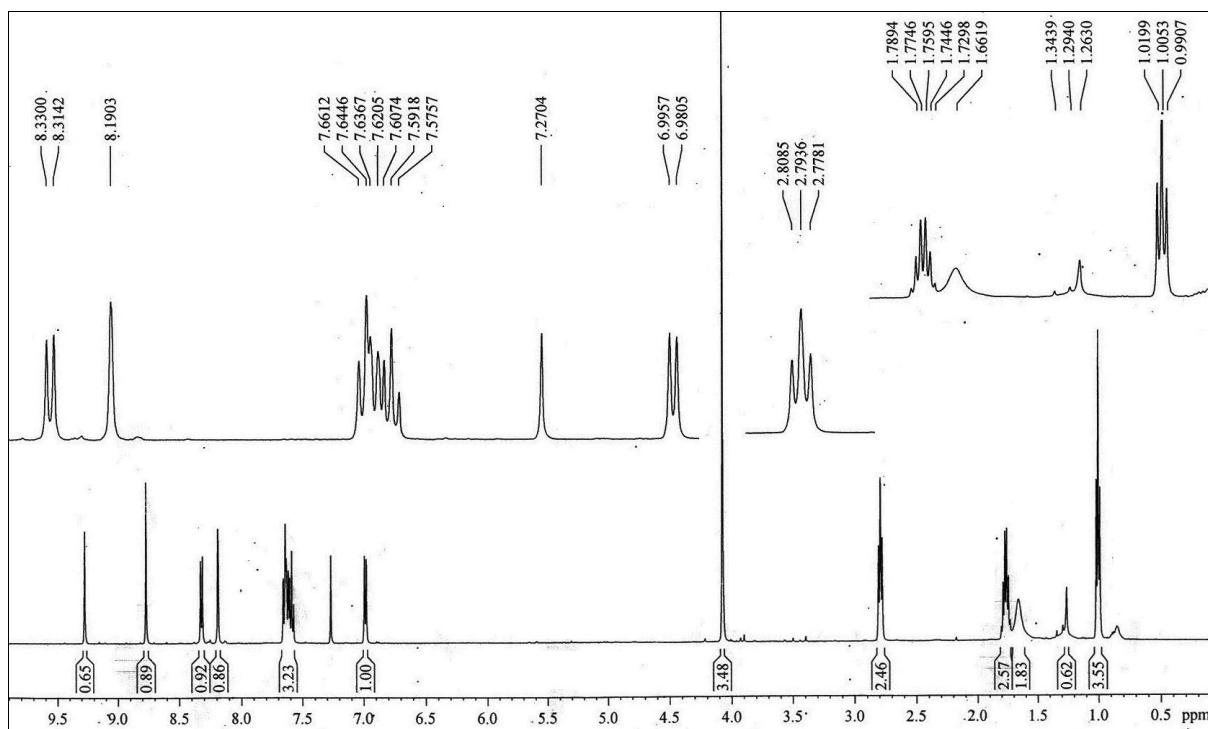
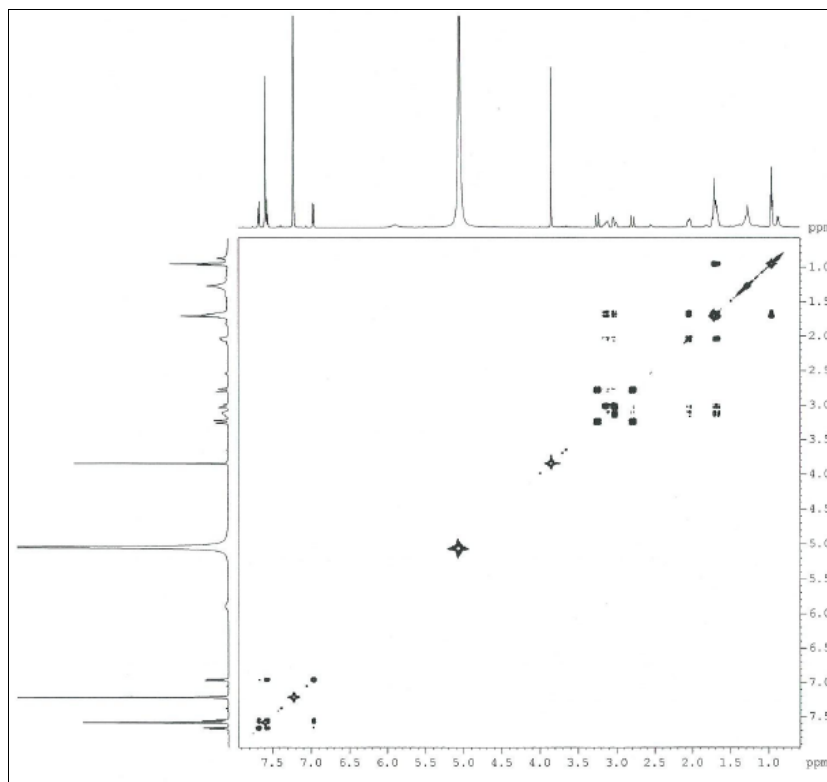
Figura 44: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de M-2**Figura 45:** Espectro de RMN COSY (500 MHz, CDCl_3) de M-2

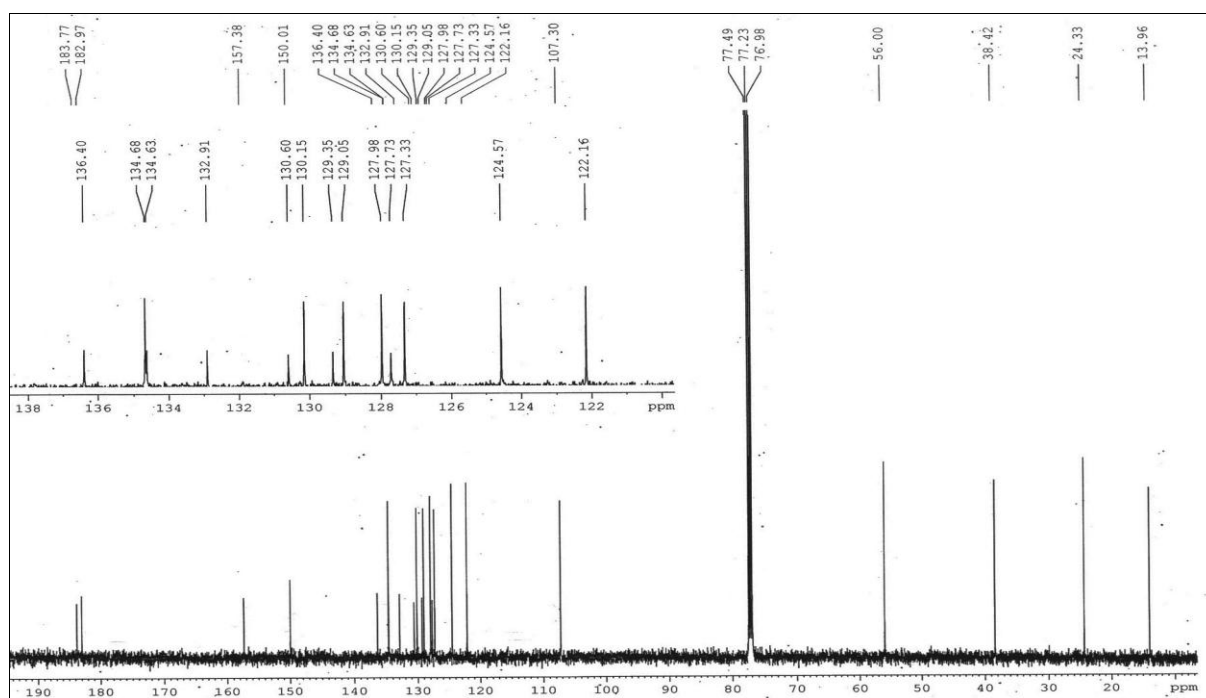
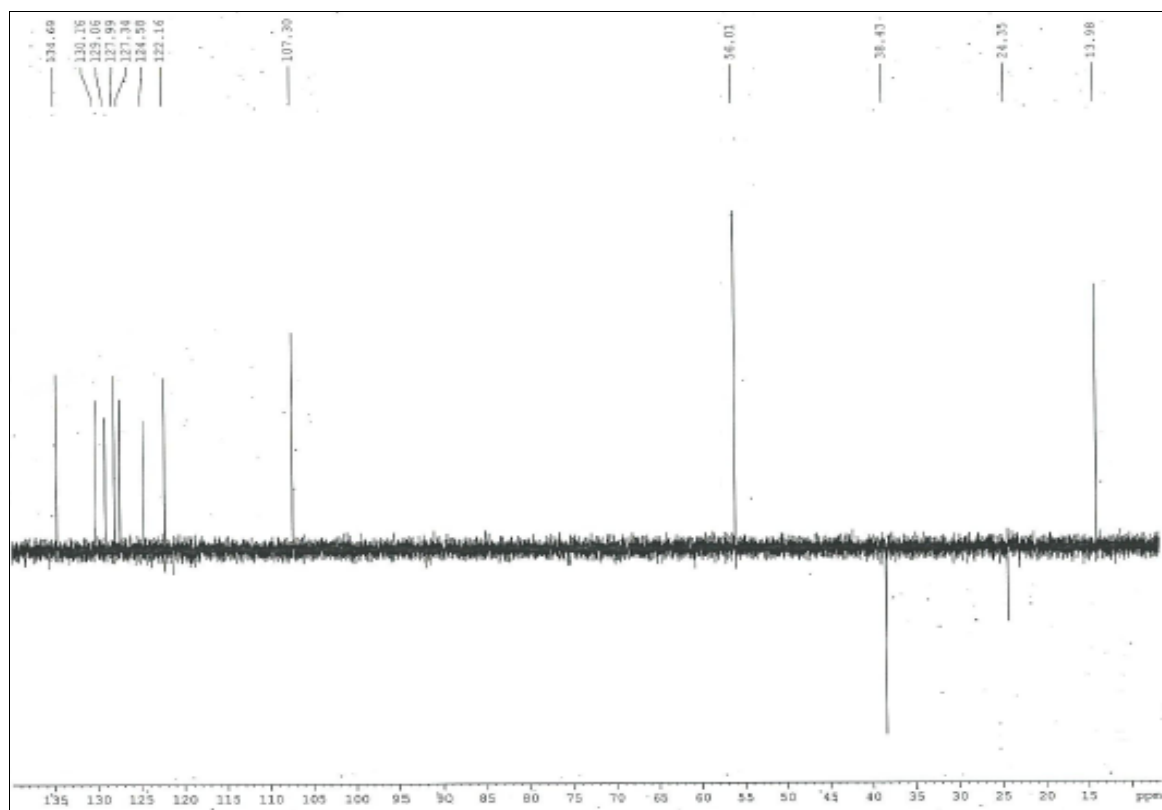
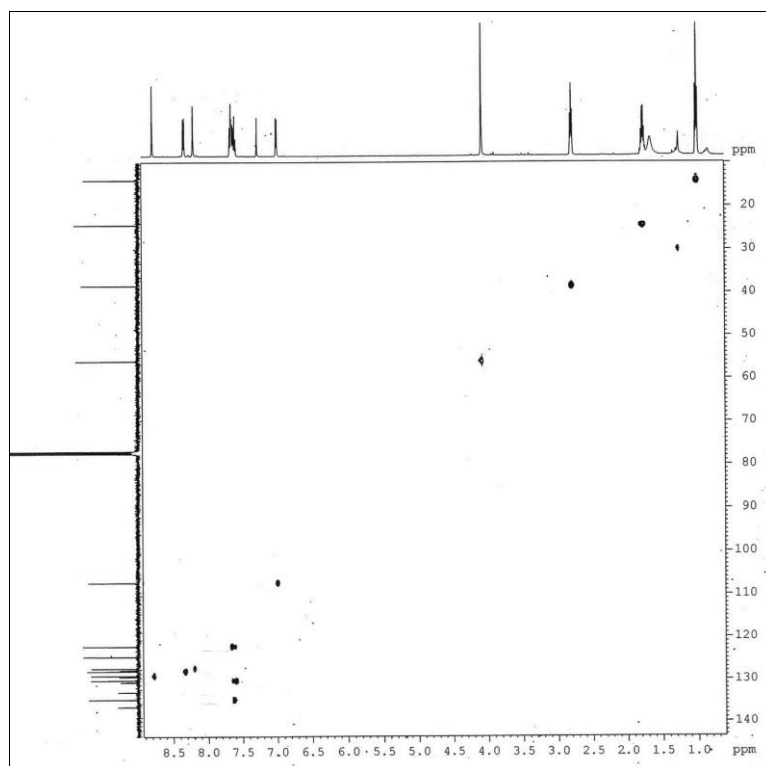
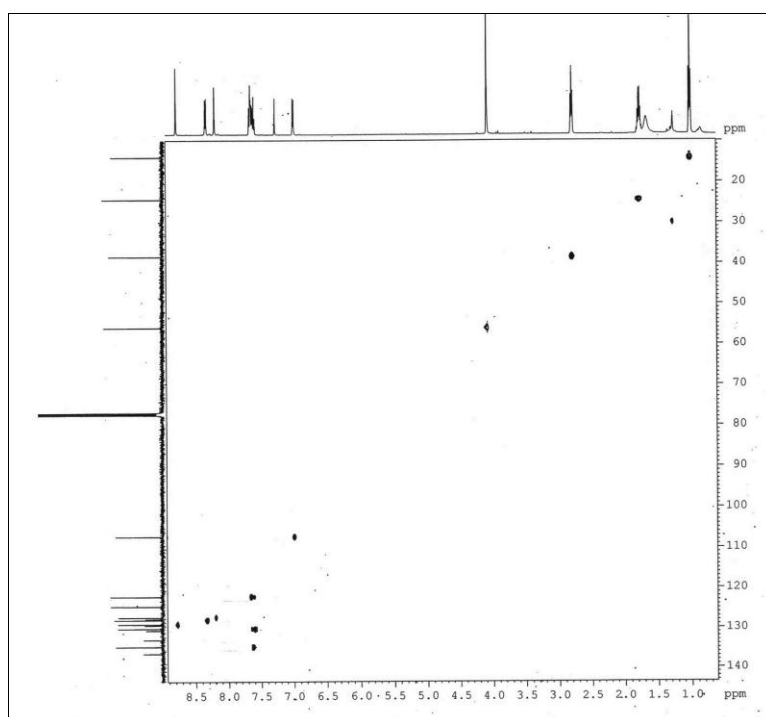
Figura 46: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de M-2**Figura 47:** Espectro de RMN DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) de M-2

Figura 48: Espectro de RMN HSQC (125 Mhz, CDCl_3) de M-2**Figura 49:** Espectro de RMN HMBC (125 Mhz, CDCl_3) de M-2

4.2.3 Determinação estrutural de M-3

O metabólito secundário denominado M-3 (6,5 mg) foi isolado a partir da fração F-3 do extrato ACOEt de *Micromonospora*. sp (item 5.4.2, p. 149), utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Este composto apresentou-se como uma resina amarela, com rotação específica de $[\alpha]_D^{20} -65$ (c 0.02, CHCl₃).

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 51, p. 100), apresentou uma banda larga centrada em 3400 cm⁻¹, referente a vibração de deformação axial de ligação OH; absorções em 2952, 2921 e 2849 cm⁻¹ características de vibrações de deformação axial de ligação C-H; uma banda intensa em 1660 cm⁻¹, associada à deformação axial de ligação C=O, além de bandas em 1611 e 1465 cm⁻¹ compatíveis com deformação axial de C=C de aromáticos.

O espectro de massas de alta resolução (Fig. 52, p. 100), obtido por ionização por *electrospray* e no modo positivo, mostrou um pico referente a molécula protonada $[M + H]^+$ em m/z 351.1575 (calculada m/z 351.1596), indicando a fórmula molecular C₂₂H₂₂O₄. Adicionalmente, foi também observado um pico mais intenso em m/z 333.1472 referente à perda de uma molécula de água.

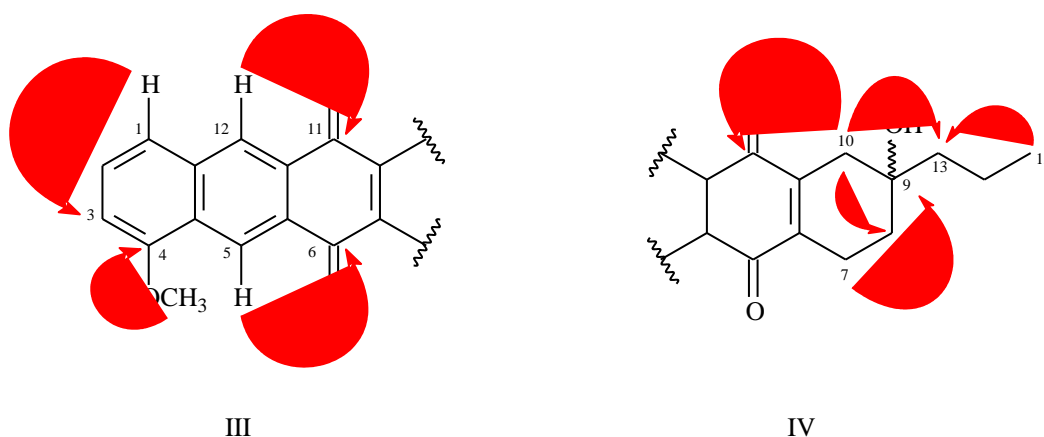
O espectro de RMN ¹H [500 MHz, C₅D₅N] (Fig. 53, pág. 101), exibiu cinco sinais na região de hidrogênios aromáticos, sendo os simpletos em δ_H 9,30 (H-5) e 8,96 (H-12) os mais desprotegidos e condizentes com hidrogênios em posição *peri* a carbonila. Observou-se também um sinal simpleto, com integração para três hidrogênios, em δ_H 3,84 condizente com uma metoxila, e um sinal triplete, referente a uma metila, em δ_H 0,95 que juntamente com os sinais em δ_H 1,70 e 1,75, cada um integrado para dois hidrogênios, justificam um grupamento propila na molécula. Ainda no referido espectro foram observados sinais (dupletos e multipletos) referentes aos hidrogênios metilênicos ligados a anel aromático ou próximos a oxigênio: H-7 (δ_H 3,12 e 3,01), H-8 (δ_H 2,03 e 1,65) e H-10 (δ_H 3,24 e 2,78). No experimento COSY (Fig. 54, p. 101) foi possível observar os acoplamentos geminais e vicinais referentes a esses hidrogênios (H-7, H-8 e H-10).

O espectro de RMN ¹³C-CPD [125 MHz, C₅D₅N] (Fig. 55, p. 102), mostrou sinais referentes a vinte e dois átomos de carbono. A análise comparativa com o espectro DEPT 135° (Fig. 56, p. 102), revelou a presença de cinco carbonos metínicos, todos na região de aromáticos, cinco carbonos metilênicos e dois carbonos metílicos, sendo o sinal em δ_C 56,5 oxigenado, caracterizando um grupo metoxila. Constatou-se ainda a presença de dez carbonos

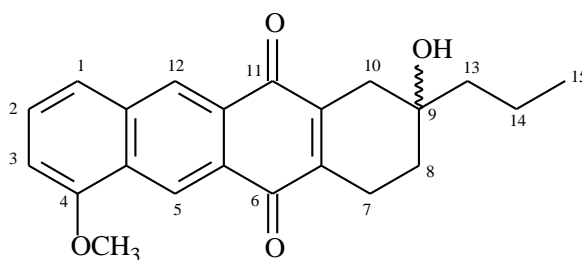
não-hidrogenados, dos quais os sinais em δ_C 184,9 (C-6) e 185,5 (C-11) foram compatíveis com carbonilas. Os sinais com deslocamentos químicos em δ_C 69,2 (C-9) e 157,9 (C-4) foram inferidos a carbonos oxigenados.

O experimento de correlação bidimensional – HMBC (Fig. 57, p. 103), mostrou correlações a três ligações dos hidrogênios em δ_H 9,30 (H-5) e 8,96 (H-12), ambos peri a carbonila, com os carbonos em δ_C 184,9 e 185,5 respectivamente, justificando a posição das carbonilas nos carbonos C-6 e C-11. A correlação dos hidrogênios metilênicos diastereotópicos em δ_H 3,24/2,78 (2H-10) com os carbonos em δ_C 33,2 (C-8) e 46,3 (C-13) e dos hidrogênios em δ_H 3,01/3,12 (2H-7) com o carbono em δ_C 69,2 (C-9) confirma a posição dos grupamentos n-propila e hidroxila no carbono C-9. Essas e outras correlações importantes estão retratadas nas subestruturas III e IV (Figura 50).

Figura 50: Acoplamentos à longa distância (HMBC) de M -3



Levando-se em consideração as informações acima discutidas e a comparação com dados descritos na literatura, conclui-se que o referido composto trata-se de um novo derivado antraciclônico denominado 7,8,9,10-tetrahidro-9-hidroxi-4-metoxi-9-propiltetraceno-6,11-diona. Infelizmente, não foi possível determinar a estereoquímica do único estereocentro C-9. A Tabela 9 (p. 99) mostra os deslocamentos químicos de RMN 1H e ^{13}C para M-3.



7, 8, 9,10-Tetra-hidro-9-hidroxi-4-metoxi-9-propiltetraceno-6,11-diona

Tabela 9: Dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de M-3

C	HSQC	
	δ_{C}	δ_{H} (multip, $J_{\text{H,H}}$)
1	122,9	7,65 (d, $J = 8,0$ Hz)
2	131,0	7,56 (t, $J = 8,0$ Hz)
3	108,4	6,96 (d, $J = 8,0$ Hz)
4	157,9	
4a	127,8	
5	123,6	9,30 (s)
5a	129,4	
6	184,9	
6a	147,2	
7	22,6	3,12 (m) e 3,01 (d, $J = 18,7$ Hz)
8	33,2	2,03 (m) e 1,65 (m)
9	69,2	
10	37,2	3,24 (d, $J = 19,1$ Hz) e 2,78 (d, $J = 19,1$ Hz)
10a	145,4	
11	185,5	
11a	132,2	
12	128,6	8,96 (s)
12a	136,8	
13	46,3	1,70 (m)
14	17,6	1,67 (m)
15	15,7	0,95 (t, $J = 6,8$ Hz)
4-OCH ₃	56,5	3,84 (s)

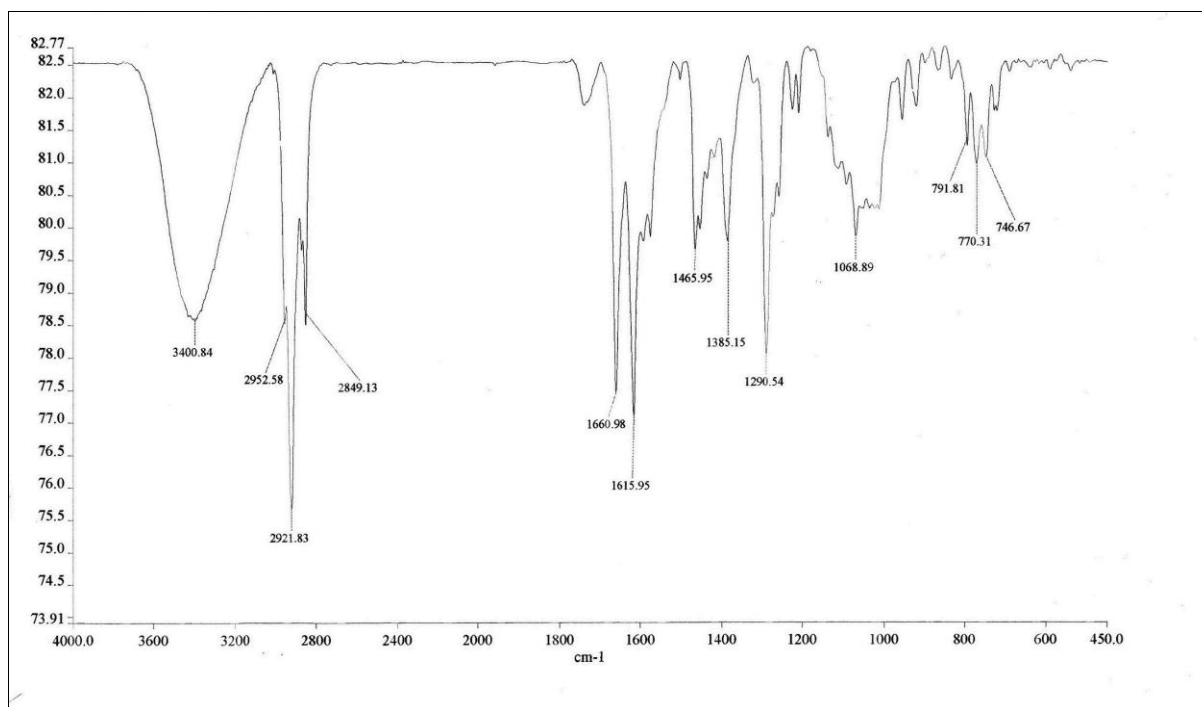
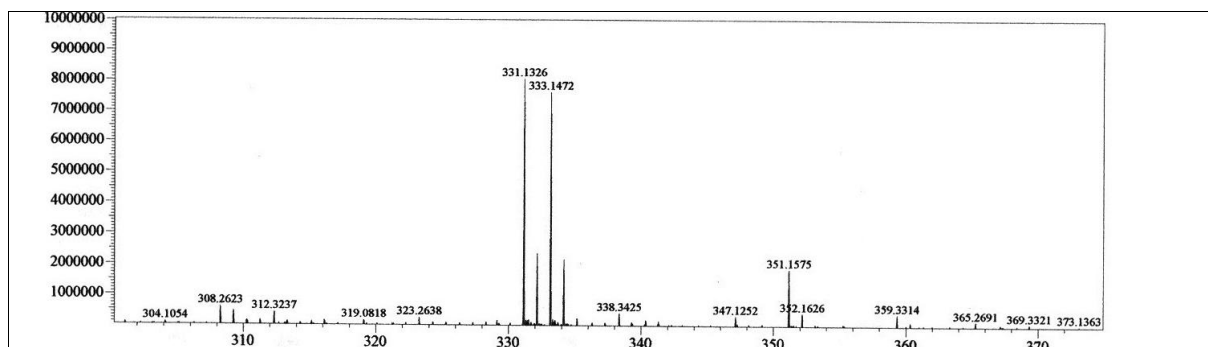
Figura 51: Espectro de absorção na região do infravermelho de M-3**Figura 52:** Espectro de massa de alta resolução de M-3

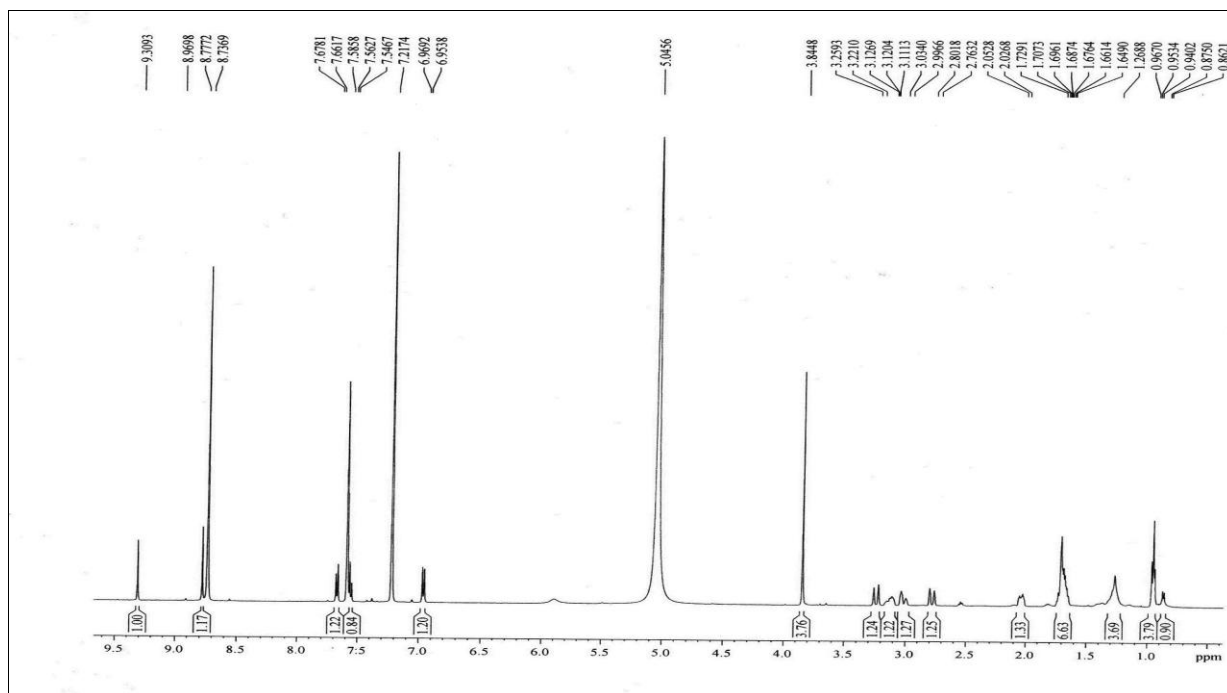
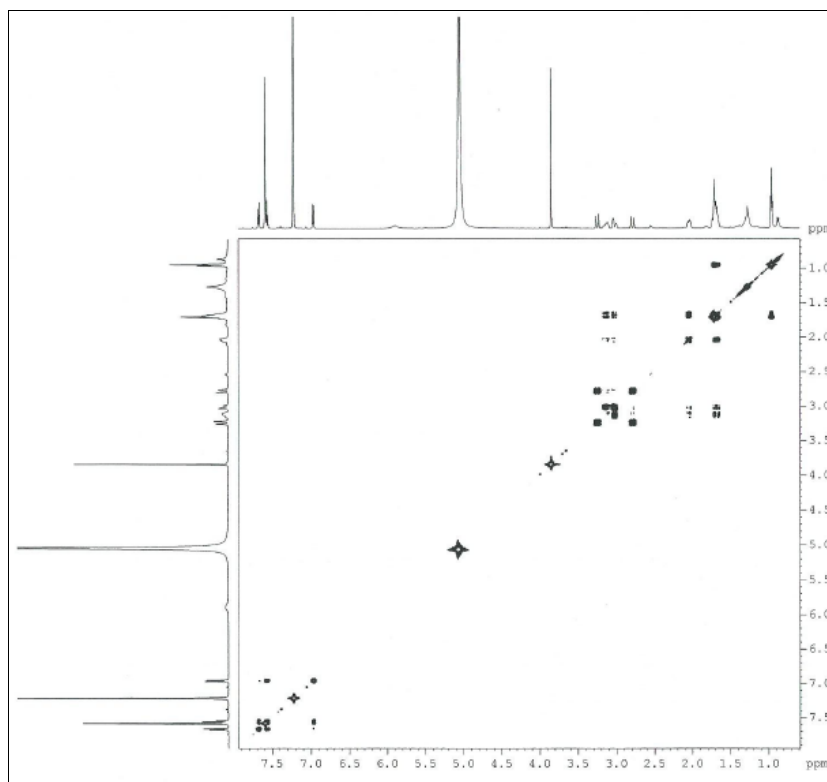
Figura 53: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de M-3**Figura 54:** Espectro de RMN COSY(125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de M-3

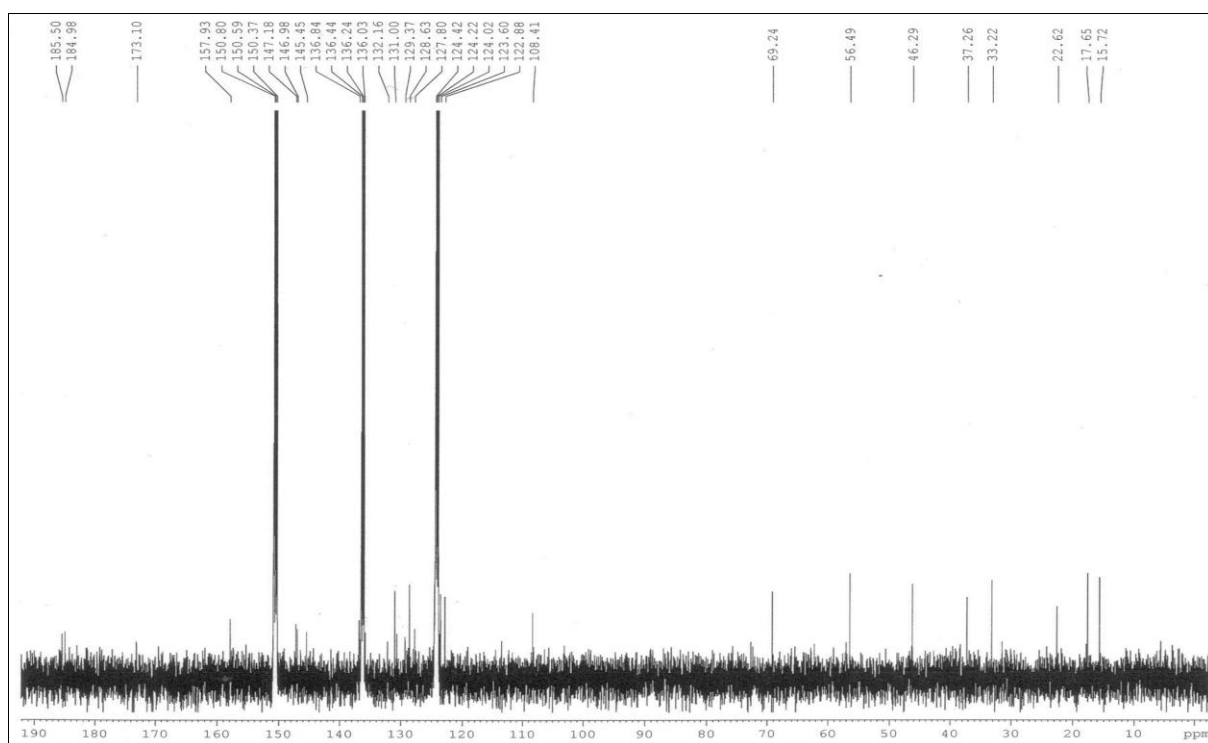
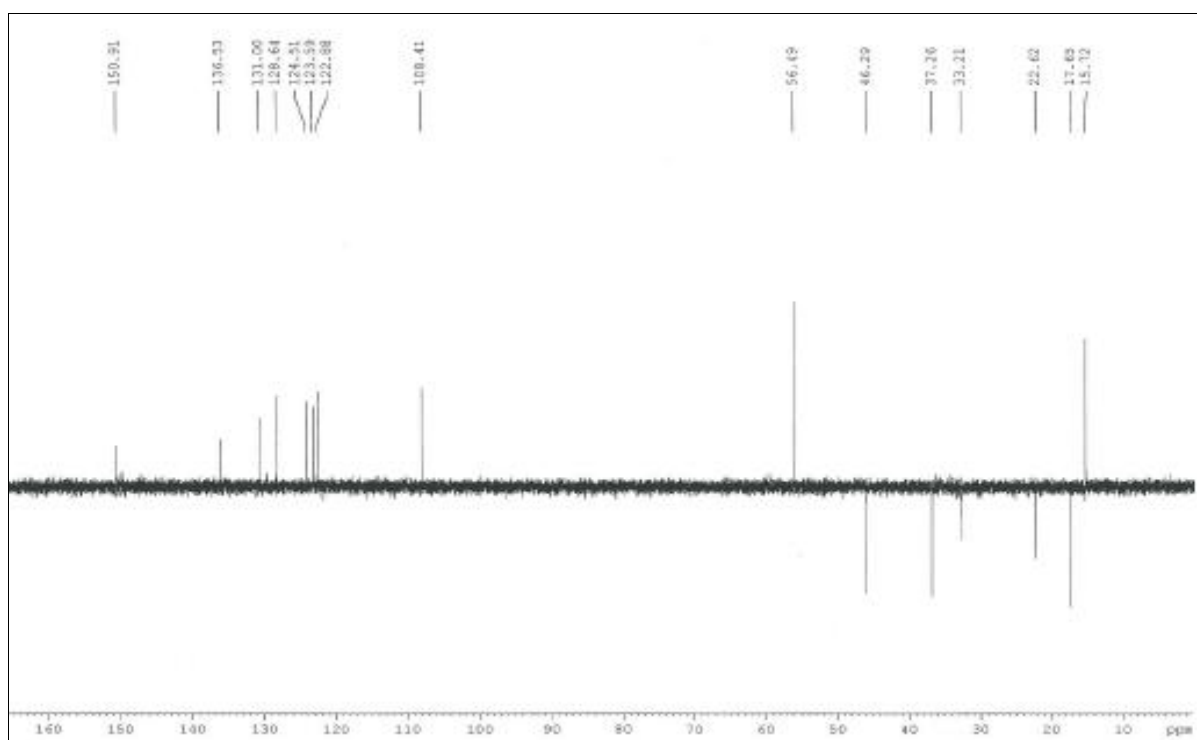
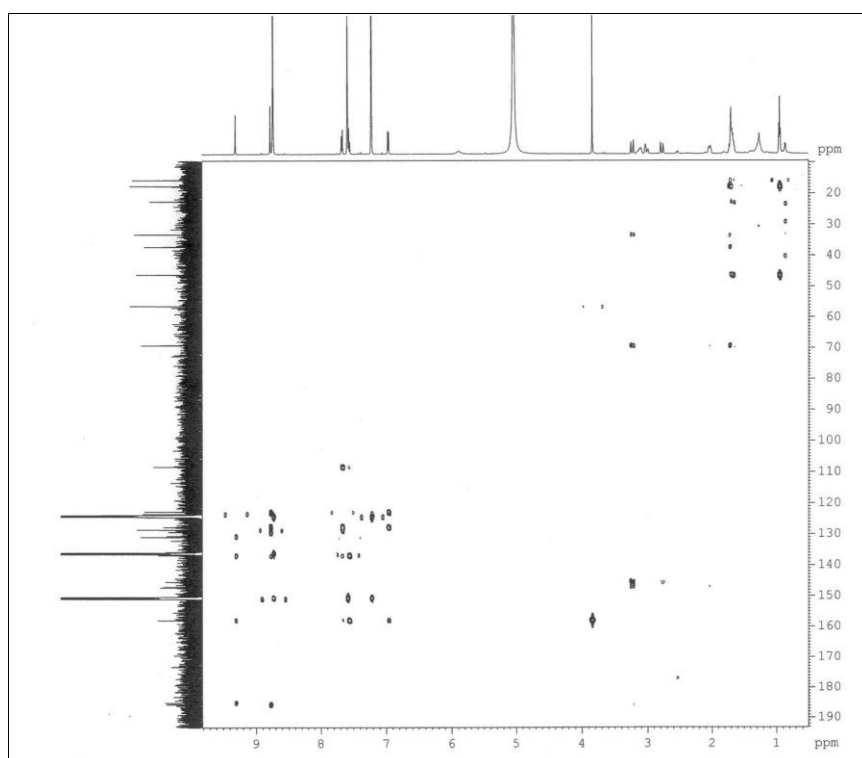
Figura 55: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de M-3**Figura 56:** Espectro de RMN DEPT 135 (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de M-3

Figura 57: Espectro de RMN HMBC (125MHz, C₅D₅N) de M-3

4.2.4 Determinação estrutural de M-4

A fração F-4 foi fracionada por coluna *flash* isocrática com o sistema hexano/AcOEt (9:1) originando 23 frações (item 5.4.2, pág. 149). O composto M-4 (2,1 mg) foi isolado das frações 16/20 como um sólido amarelo com ponto de fusão na faixa de 173,5-173,8 °C e rotação específica de $[\alpha]_D^{25} -61.5$ (*c* 0.013, CHCl₃).

O espectro de absorção na região do IV (Fig. 59, p. 108) apresentou intensa absorção em 3400 cm⁻¹, típica de deformação axial de ligação O-H de alcoóis e/ou fenóis; absorções em 2952, 2922 e 2849 cm⁻¹ características de vibrações de deformação axial de ligação C-H; absorções referentes à deformação axial de ligação C=O para éster em 1729 cm⁻¹ e para cetona conjugada em 1606 cm⁻¹; e ainda absorções na faixa de 1277 a 1022 cm⁻¹, correspondentes à deformação axial de ligação C-O.

O espectro de massa de alta resolução (Fig. 60, p. 108) exibiu no modo negativo o pico em *m/z* 441,1170 (calculado *m/z* 441.1185) referente à molécula desprotonada [M-H]⁻, indicando a fórmula molecular C₂₃H₂₂O₈ a qual apresenta treze graus de insaturações. O referido espectro exibiu também um pico condizente com a perda de uma molécula de H₂O, em *m/z* 423.3205 e outro compatível com a perda de CH₃OH em *m/z* 409.3070.

O espectro de RMN ¹H [500 MHz, CDCl₃] (Fig. 61, p. 109), mostrou sinais para hidrogênios aromáticos em δ_H 7,85 (H-1), 7,70 (H-2) e 7,30 (H-3), todos com integração para um hidrogênio, e com mesmo valor de constante de acoplamento (*J*=8,0 Hz). Exibiu também um sinal tripleto, para um hidrogênio oximetínico, em δ_H 5,32 (H-7) e um sinal simpleto, em δ_H 4,27 (H-10), referente a um hidrogênio metínico posicionado α à carbonila. Ainda nesse espectro foram observados sinais para hidrogênios metilênicos e metílico caracterizando um grupamento n-propila.

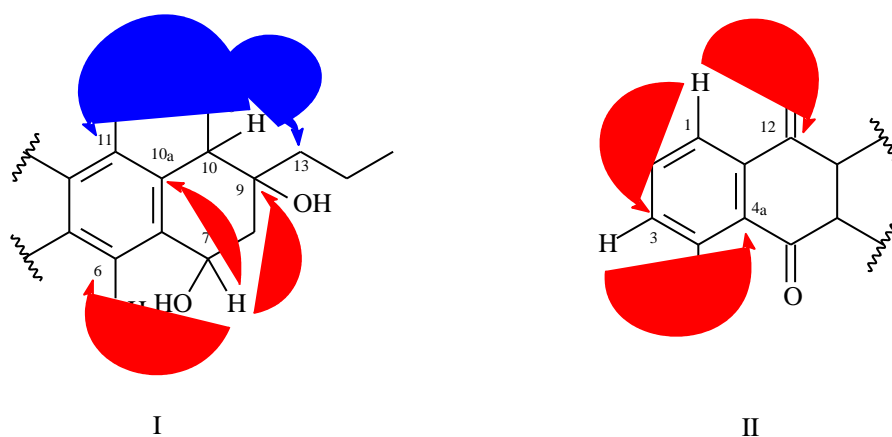
O experimento COSY (Fig. 62, p. 109) exibiu os acoplamentos vicinais entre os hidrogênios aromáticos H-1 com H-2 e deste com H-3, bem como os acoplamentos entre o hidrogênio H-7 com 2H-8, além do acoplamento dos hidrogênios metílicos e metilênicos justificando a presença do grupamento propila.

O espectro de RMN ¹³C-CPD [125 MHz, CDCl₃] (Fig. 63, p. 110), apresentou 23 linhas espectrais, revelando similaridade com os esqueletos antraquinônicos das estruturas de M-1, M-2 e M-3, já determinadas. O padrão de hidrogenação foi determinado pela comparação dos espectros de RMN ¹³C e HSQC (Fig. 64, pág. 110) a partir dos quais verificou-se cinco carbonos metínicos, sendo o sinal em δ_C 62,8 (C-7) oxigenado; três

carbonos metilênicos; dois carbonos metálicos, sendo um oxigenado em δ_C 52,6 (C-17) e treze carbonos não hidrogenados, sendo sete deles oxigenados, onde os sinais em δ_C 171,5; 186,6 e 191,1 são referentes à carbonílas.

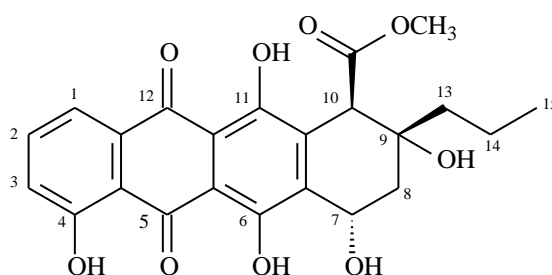
Através do experimento HMBC (Fig. 65, pág. 111), pode-se posicionar uma hidroxila no carbono C-7 devido às correlações a três ligações do hidrogênio oximetínico H-7 (δ_H 5,32) com os carbonos C-6 (δ_C 156,1), C-10a (δ_C 137,4) e C-9 (δ_C 71,6). Da mesma forma pode-se determinar a posição do grupo metoxicarbonil no carbono C-10 e do grupo propila no carbono C-9, através das correlações a longa distância do hidrogênio em δ_H 4,27 (H-10) com os carbonos em δ_C 157,2 (C-11), 42,5 (C-13) e com a carbonila em δ_C 171,5 (C-16). A Figura 58 mostra essas e outras correlações importantes para o composto M-4.

Figura 58: Acoplamentos a longa distância (HMBC) observadas para M-4

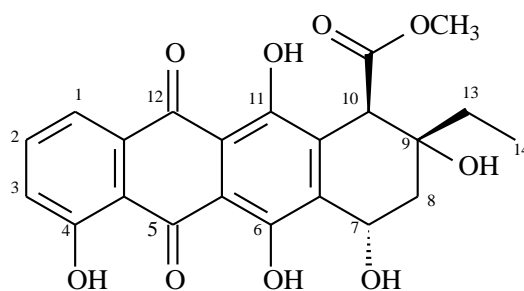


A estereoquímica relativa dos estereocentros presentes em M-4 foi deduzida pelo experimento NOESY (Fig. 66, p. 111), pelos valores das constantes de acoplamentos e através da comparação com compostos similares encontrados na literatura (YANG *et al.*, 2004; JOHDO *et al.*, 1991). As interações espaciais observadas no espectro NOESY do hidrogênio H-10 (δ_H 4,27) com os hidrogênios H-13a (δ_H 1,68) e H-14a (δ_H 1,78) sugerem que os grupos metoxicarbonil e n-propil estejam β posicionados. A configuração do carbono C-7 foi determinada baseando-se na multiplicidade e no valor da constante de acoplamento observado para H-7 e para os hidrogênios metilênicos 2H-8. O hidrogênio H-7 mostrou multiplicidade tripleto e valor de constante de acoplamento pequena $J = 3.0$ Hz, sugerindo, acoplamentos equatorial-axial e equatorial-equatorial com 2H-8, visto que acoplamento axial-axial mostraria uma constante com valor acima de 10.0 Hz. Logo o hidrogênio H-7 encontra-se em posição β .

A interpretação dos dados espectroscópicos de M-4, bem como a análise comparativa com dados da literatura permitiu concluir que o metabólito secundário em discussão tratava-se de um novo composto denominado 10 β -metoxicarbonil-7, 8, 9,10-tetrahidro-4, 6,7 α ., 9 α ., 11-pentahidroxi-9-propiltetraceno-5,12-diona, um análogo da ϵ -rhodomycinone (JOHDO *et al.*, 1991). A Tabela 10 apresenta os dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C do metabólito M-4 e os compara com a ϵ -Rhodomycinona.



10 β -metoxicarbonil-7, 8, 9,10-tetrahidro-4, 6,7 α ,9 α ,11-pentahidroxi-9-propiltetraceno-5,12-diona



ϵ -Rhodomycinona

Tabela 10: Dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C do metabólito M-4 e da ε -Rhodomycinone (JOHDO *et al.*, 1991).

C	M-4 (CDCl_3)		ε -Rhodomycinone (CDCl_3 - CD_3OD 10:1)
	δ_{C}	δ_{H} (multip, $J_{\text{H,H}}$)	δ_{C}
1	119,9	7,85 (d, $J = 8,0$ Hz)	119,9
2	137,6	7,70 (t, $J = 8,0$ Hz)	137,7
3	125,0	7,30 (d, $J = 8,0$ Hz)	124,6
4	162,9		162,1
4a	116,2		115,6
5	191,1		190,3
5a	111,7		111,1
6	156,1		155,9
6a	135,2		134,4
7	62,8	5,32 (t, $J = 3,0$ Hz)	61,8
8	35,2	2,29 (d, $J = 3,0$ Hz)	34,2
9	71,6		71,5
10	51,9	4,27 (s)	52,3
10a	137,4		136,9
11	157,2		156,2
11a	111,5		110,9
12	186,3		185,7
12a	133,6		133,0
13	42,6	1,68 (td, $J = 12,5$ e $3,7$ Hz) 1,49 (td, $J = 12,5$ e $4,0$ Hz)	32,4
14	15,9	1,78 (m) 1,59 (m)	16,5
15	14,8	1,00 (t, $J = 7,2$ Hz)	-
16	171,5		171,3
17	52,6	3,73 (s)	51,5
4-OH		12,05 (s)	
6-OH		13,41 (s)	
11-OH		12,87 (s)	

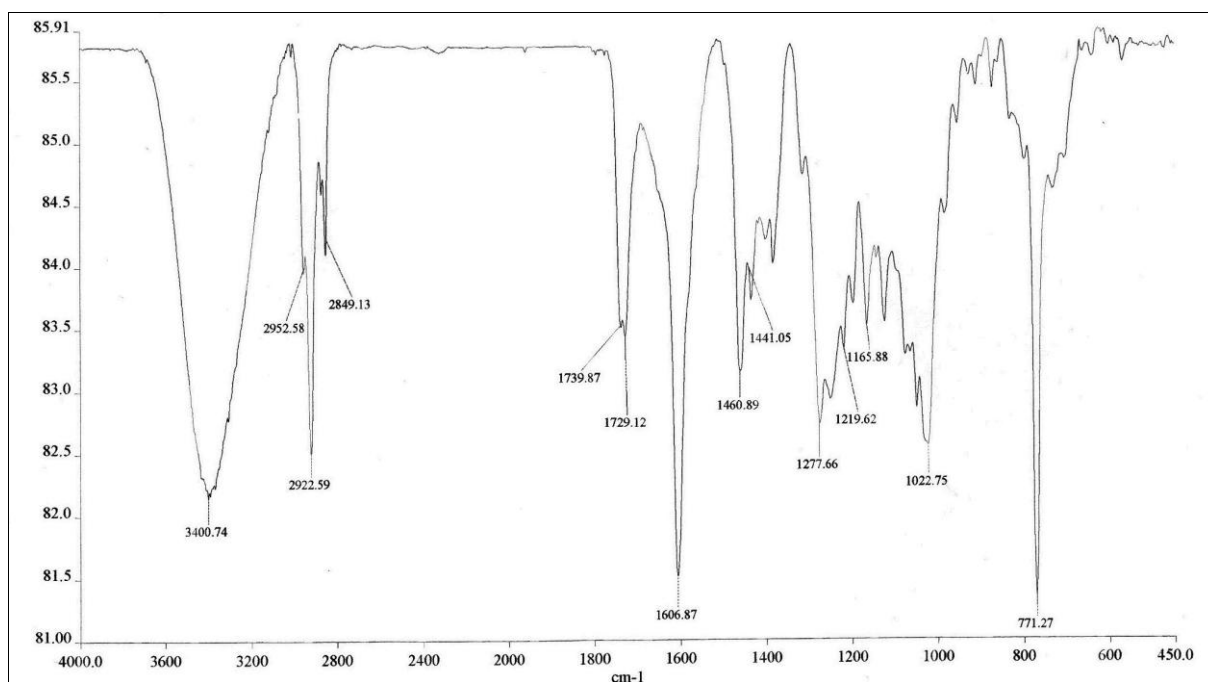
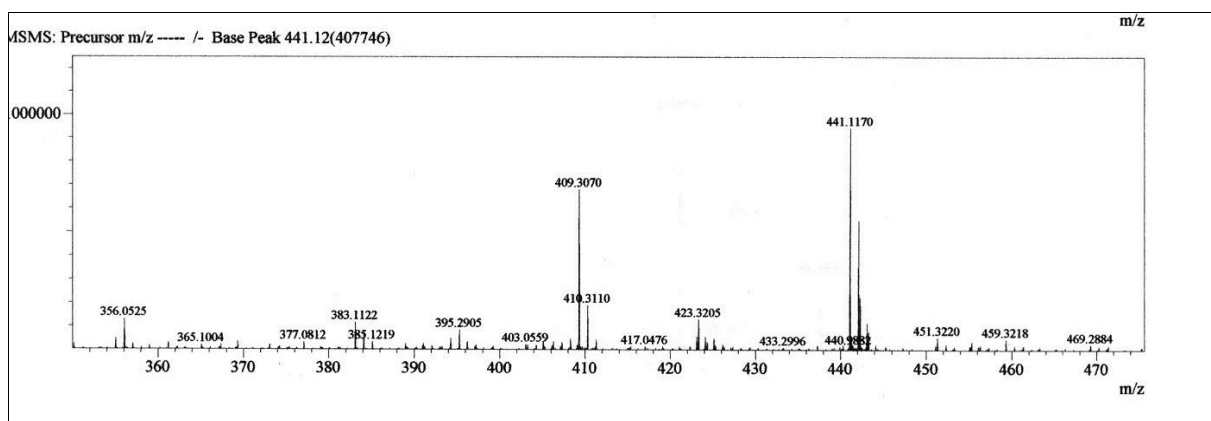
Figura 59: Espectro de absorção no infravermelho de M-4**Figura 60:** Espectro de massa de alta resolução de M-4

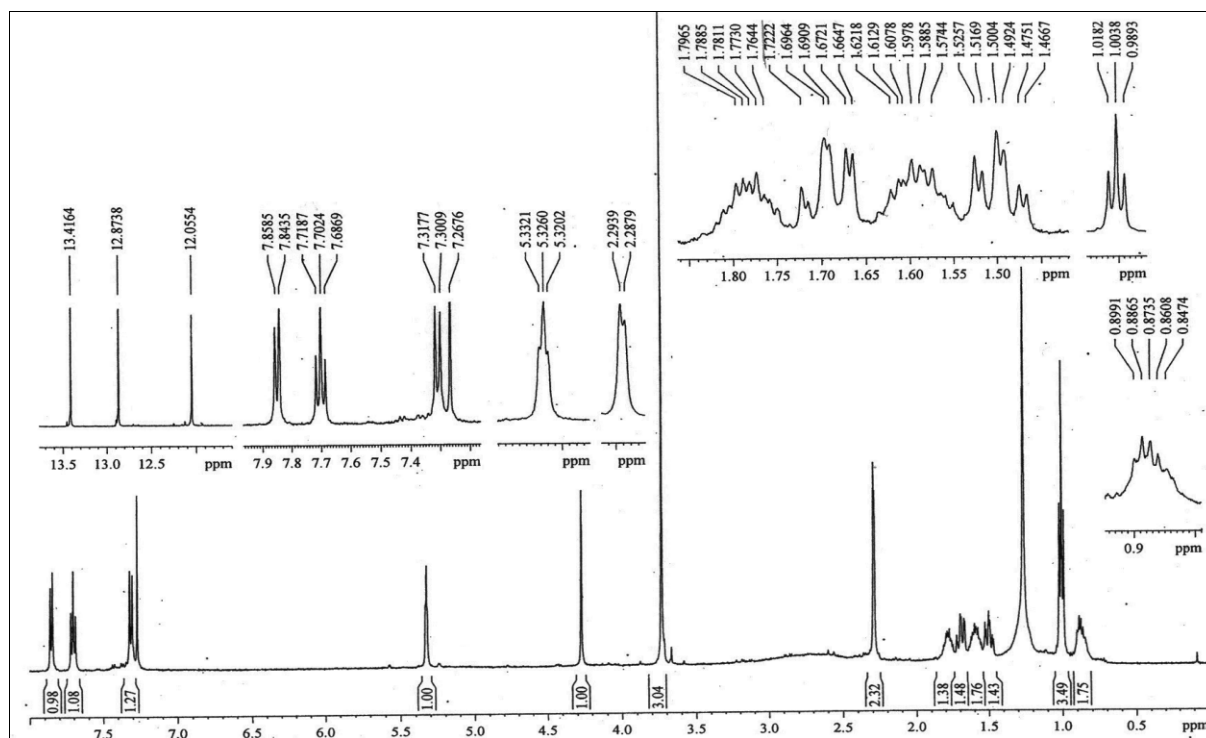
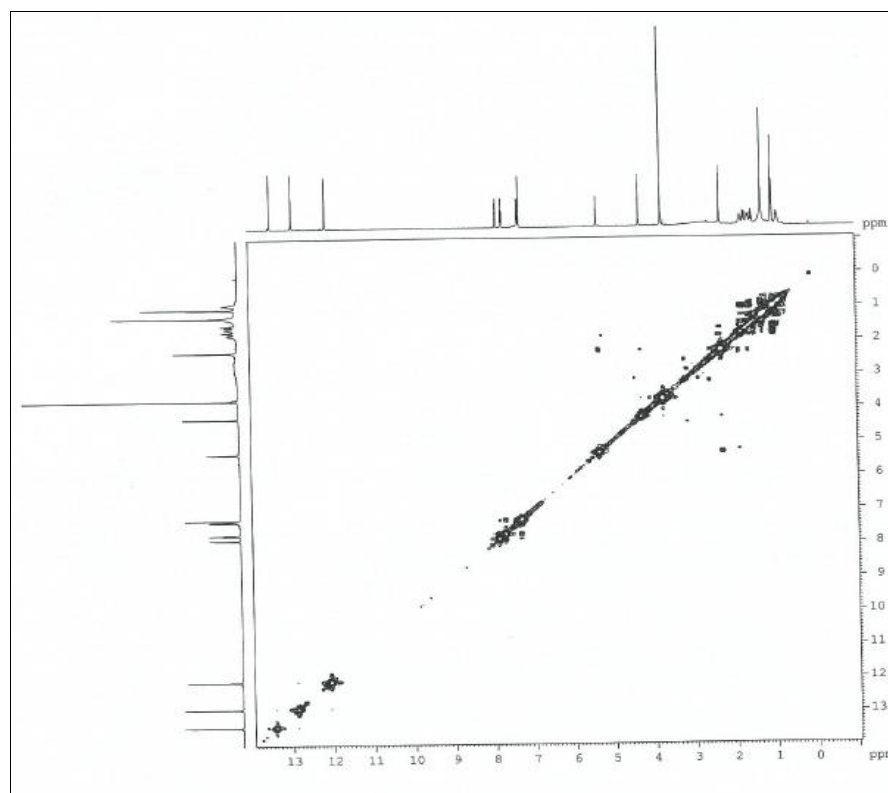
Figura 61: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de M-4**Figura 62:** Espectro de RMN COSY(500 MHz, CDCl_3) de M- 4

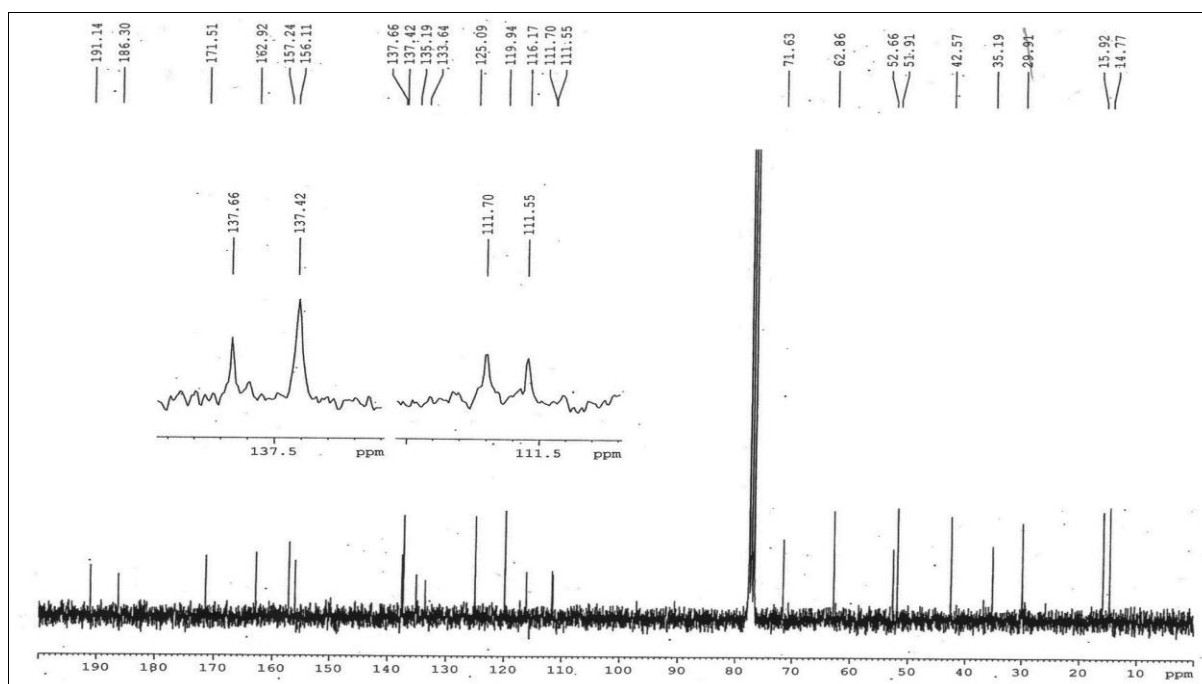
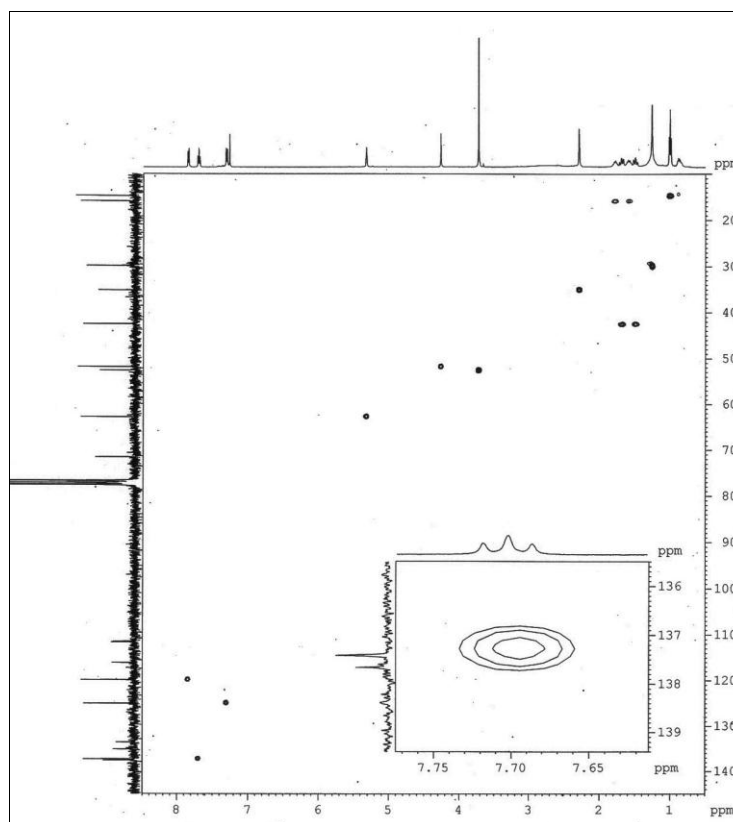
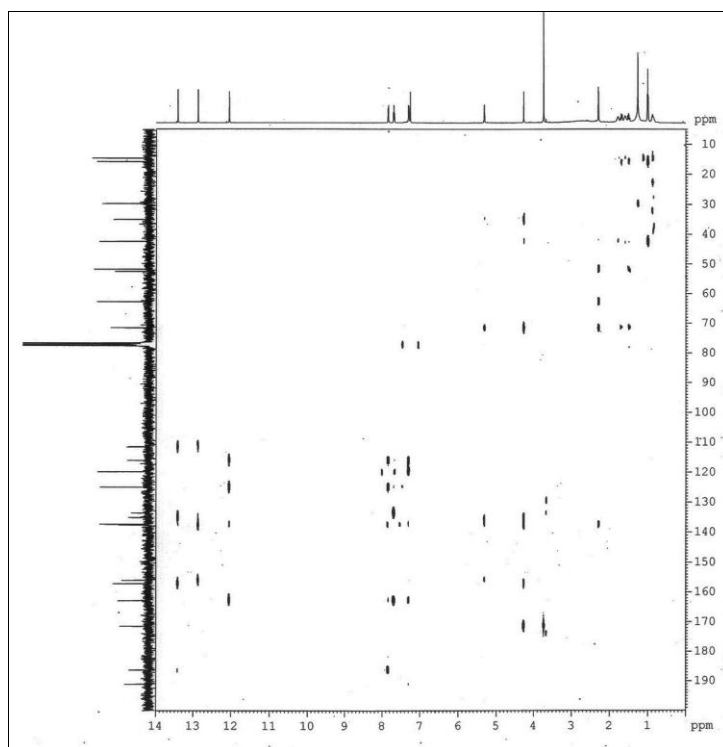
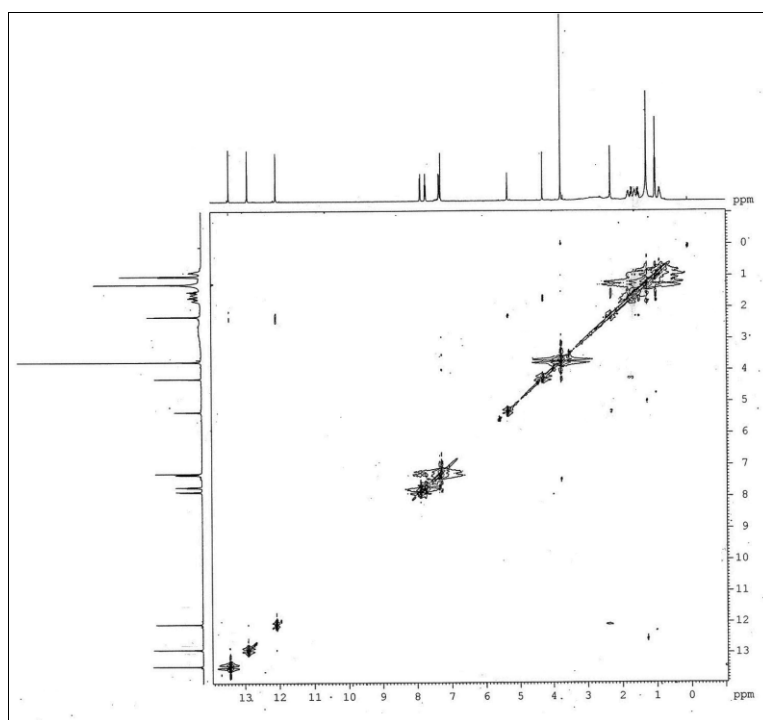
Figura 63: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de M-4**Figura 64:** Espectro de RMN HSQC (125 MHz, CDCl_3) de M-4

Figura 65: Espectro de RMN HMBC (125 MHz, CDCl_3) de M-4**Figura 66:** Espectro de RMN NOESY (125 MHz, CDCl_3) de M-4

4.2.5 Atividade Biológica

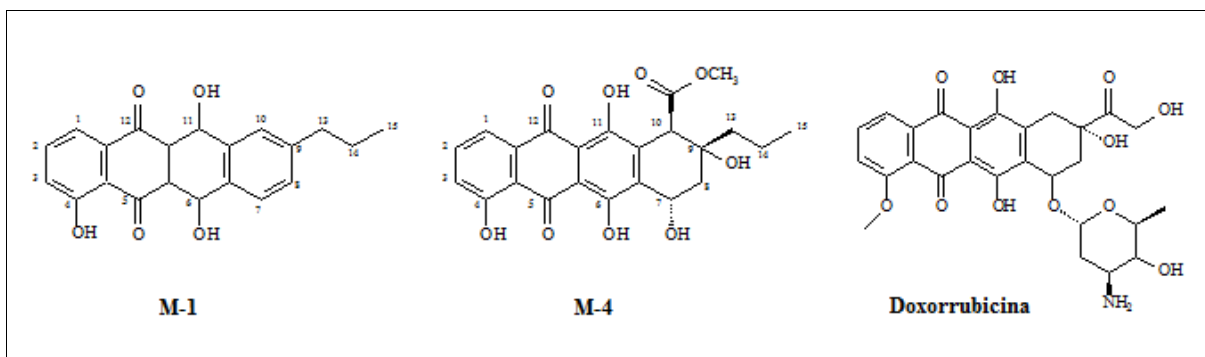
Os metabólitos M-1 a M-4 foram avaliados quanto a possível atividade anti-tumoral frente a linhagem celular HCT-8 (adenocarcinoma humano) utilizando o o ensaio do MTT após exposição de 72 horas. Os valores de IC_{50} e de 95% CI foram obtidos por regressão não linear utilizando o programa GraphPad (Intuitive Software for Science, San Diego, CA). Na Tabela 11 estão sumariados os resultados desse ensaio.

Tabela 11: Citotoxicidade das antraciclínonas M-1 a M-4

Compostos	M-1	M-2	M-3	M-4	Doxorrubicina
IC_{50}	12.74	> 70	> 70	6.18	0.09
(95% CI)	9.94 -19.13			5.03 – 7.59	0.06 – 0.13

Conforme pode ser verificado, M-1 e M-4 mostraram citotoxicidade moderada com valores de IC_{50} de 12,74 e 6,18 μ M, respectivamente. A melhor atividade de M-4 pode esta relacionada com a presença do grupo carbonila, ausente nos demais compostos testados. Por outro lado, a atividade da doxorrubicina, utilizada como padrão positivo, pode ser devido a presença do grupo carbonila e pelo grupamento posicionado em C-7. A Figura 67 mostra a estrutura dos metabólitos M-1, M-4 e doxorrubicina.

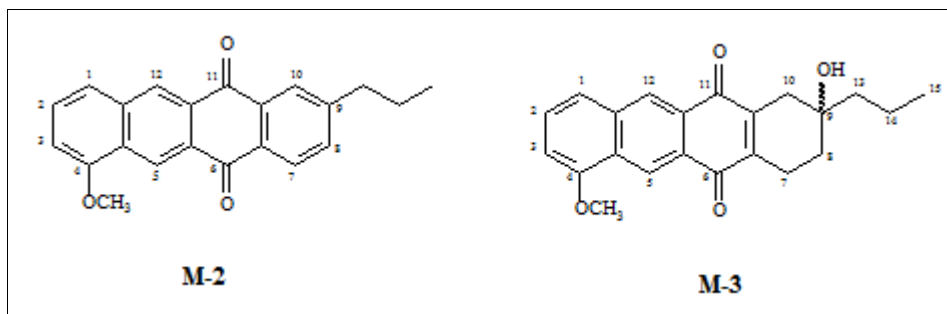
Figura 67: Metabólitos M-1 e M-4 e o padrão doxorrubicina



Os metabólitos M-2 e M-3 apresentaram IC_{50} superiores a 70 μ M e foram considerados inativos. M-2 e M-3 são menos oxigenados e possuem o núcleo quinônico no

anel C (Figura 68), diferentemente de M-1, M-4 e doxorubicina onde o núcleo quinônico se encontra no anel B.

Figura 68: Metabólitos M-2 e M-3 isolados de *Micromonospora* sp.



Os metabólitos isolados M-1 a M-4 se incluem na família das antraciclina. O elevado interesse científico e industrial em antraciclina surgiu a partir de suas notáveis propriedades farmacêuticas. A atividade antitumoral exibida por estes compostos torna-as com valor comercial. As antraciclina fazem parte dos produtos naturais mais estudados ao longo dos últimos 50 anos. A doxorubicina também pertence a essa família e atualmente é a droga mais utilizada no tratamento contra o câncer com amplo espectro antitumoral e de grande eficácia terapêutica. Outros exemplos são a daunomicina e a aclacinomicina A, que também pertencem a essa mesma classe de compostos e são excelentes drogas terapêuticas utilizadas para o tratamento de câncer no sangue. No entanto, a utilização clínica destes fármacos é dificultada pelos efeitos colaterais indesejáveis, sendo o mais sério a cardiotoxicidade relacionada a dose. Portanto, ainda existe um grande interesse na obtenção de novas substâncias sejam elas naturais ou sintéticas com melhores índices terapêuticos (LAATSCH & FOTSO, 2008).

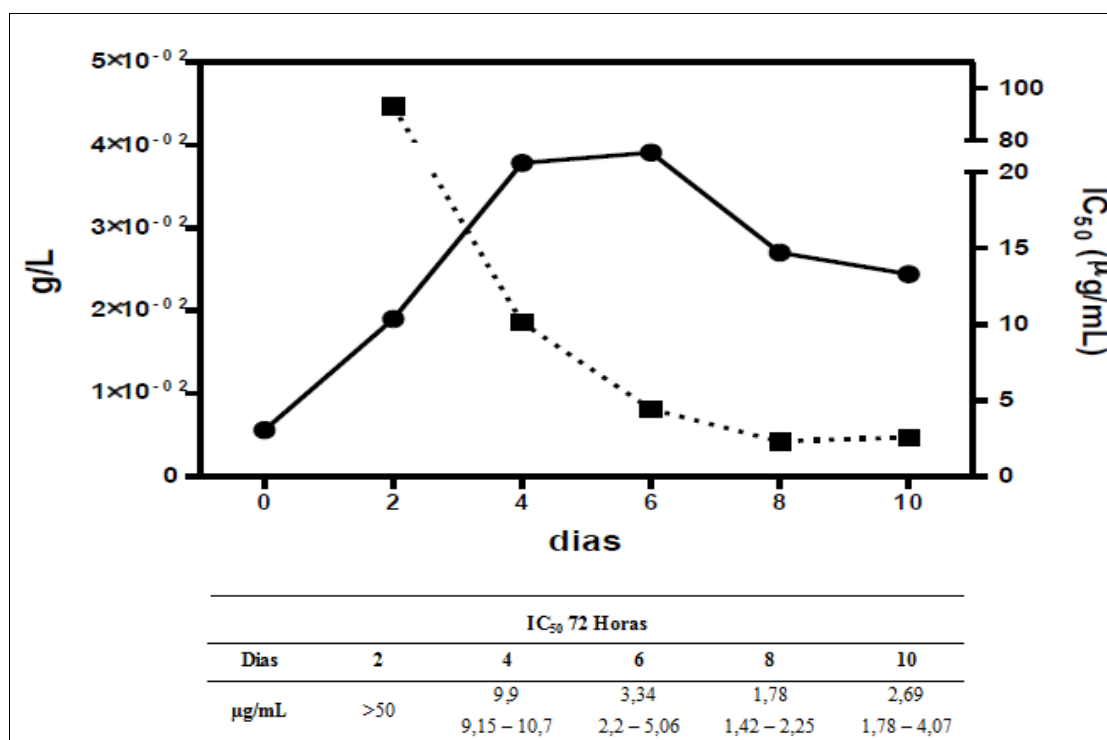
4.3 *Streptomyces* sp.

4.3.1 Curva de crescimento cinético de *Streptomyces* sp.

Inicialmente foi realizado um estudo do crescimento da bactéria *Streptomyces* sp. em condições de cultura no laboratório para determinação do tempo ótimo de crescimento para o isolamento do(s) princípio(s) ativo(s). Esse experimento foi realizado pela aluna de mestrado Paula Araújo de Abreu, no Laboratório de ecotoxicologia do Laboratório de Ciências do Mar, coordenado pela Prof. Dr. Leticia Costa Lotufo.

Conforme a Figura 69, observou-se a fase de crescimento exponencial ocorrendo do dia 0 ao dia 4. A partir daí, entre os dias 4 e 6, observou-se um platô que poderia ser descrito como fase estacionária, seguindo então com a diminuição da biomassa do sexto ao décimo dia de experimento. A linha pontilhada representa os valores de CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$) obtidos pelo ensaio do MTT, onde se pode observar uma redução no valor da CI_{50} com o decorrer dos dias, ou seja, um aumento de citotoxicidade, que parece se estabilizar a partir do oitavo dia de experimento. O menor valor de CI_{50} foi observado no oitavo dia (1,78 $\mu\text{g/ml}$) e, por isso, as extrações foram realizadas neste período de incubação.

Figura 69: Curva de crescimento de *Streptomyces* sp. (linha contínua) em g/L versus atividade citotóxica do extrato bruto (linha pontilhada) através dos valores de IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) em células HCT-8 com 72 horas de incubação.



4.3.2 Determinação estrutural de S-1

O fracionamento por CLAE do extrato AcOEt da cultura de *Streptomyces* sp., cuja curva de crescimento x atividade foi anteriormente comentada, resultou no isolamento de 49,0 mg de cristais laranjas, denominados S1, com ponto de fusão na faixa de 142-143 °C, e com absorções máximas em 218 e 368 nm no espectro de UV.

O espectro de absorção na região do IV (Fig. 71, p. 117), apresentou absorção em 3131 cm⁻¹, típica de deformação axial de ligação N-H; absorções referentes à deformação axial de ligação C=O em 1648 cm⁻¹ bem como uma absorção em 1576 cm⁻¹, correspondentes à deformação axial de ligação C=C.

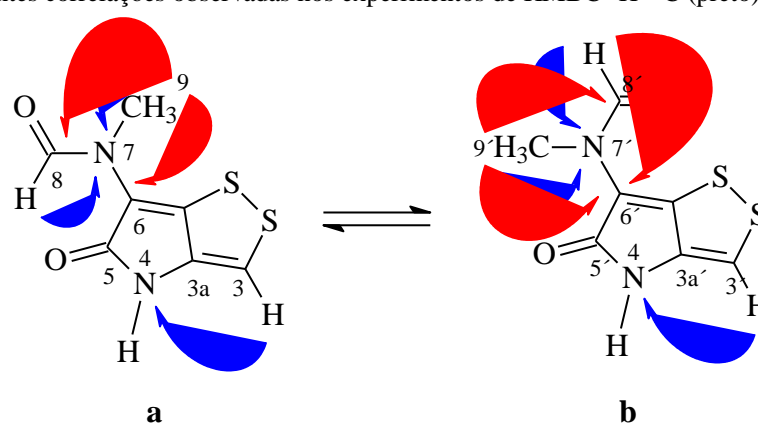
O espectro de massas de alta resolução (Fig. 72, p. 118), obtido com ionização por *electrospray* e no modo positivo, mostrou um pico referente a molécula protonada [M+ H]⁺ em *m/z* 214,9953 (calculada 214,9948), indicando a fórmula molecular C₇H₆N₂O₂S₂. Adicionalmente foi observado um pico em *m/z* 236,9764 (calculada 236,9768) referente ao aduto de sódio da molécula [M+ Na]⁺. No modo negativo, foi observado o pico referente à molécula desprotonada em *m/z* 212,9837 (calculada 212,9792).

O espectro de RMN ¹H [500 MHz, C₅D₅N] (Fig. 73, p. 118), mostrou sinais para dois prótons formamida, um em δ_H 9,08 (s, H-8) e o outro em 8,26 (s, H-8'), dois sinais para hidrogênios olefínicos em δ_H 7,27 (s, H-3) e 7,18 (s, H-3') e dois sinais simpletos integrados para três hidrogênios cada em δ_H 3,29 (s, N-Me) e 3,57 (s, N-Me'), caracterizando dois grupos metilas. Adicionalmente, exibiu os sinais em δ_H 12,41 (s) e 12,23 (s), que foram atribuídos a hidrogênios nitrogenados.

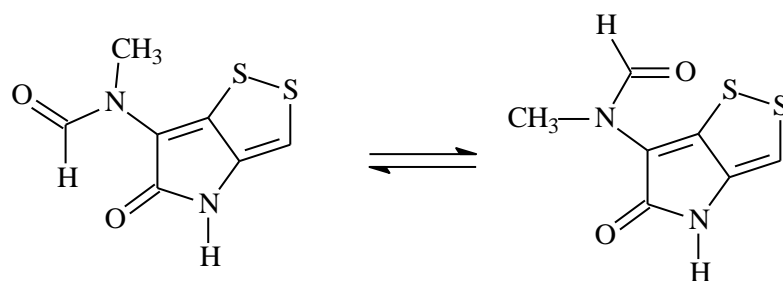
O espectro de RMN ¹³C-CPD [125 MHz, C₅D₅N] (Fig. 74, p. 119), apresentou 12 linhas espectrais, sendo o sinal em aproximadamente δ_C 136,0 sobreposto pelo solvente. Através da comparação deste experimento com o espectro bidimensional HSQC (Fig. 75, p. 119), foi possível inferir a presença de dois grupos metilas em δ_C 34,4 (C-9') e 30,3 (C-9), dois carbonos metínicos sp² em δ_C 110,6 (C-3 e C-3') e seis carbonos não hidrogenados em δ_C 117,2 (C-6'), 119,9 (C-6), 136,0 (C-6a e C-6a'), 141,8 (C-3a), 143,0 (C-3a') e 170,3 (C-5 e C-5'). Os sinais em δ_C 162,3 (C-8') e 162,9 (C-8) foram atribuídos a duas carbonilas de amida. Observou-se que o número de carbonos exibido no espectro de RMN ¹³C excede ao apresentado pela fórmula molecular obtida pelo espectro de massas. A presença de dois grupos metilas e dois prótons formamida nos levou a sugerir que o metabólito S-1 tratava-se de uma mistura de dois isômeros diastereoisoméricos.

Essa mistura foi confirmada através do experimento de correlação heteronuclear HMBC (^1H - ^{13}C) (Fig. 76, p. 120). O grupo metila na cadeia lateral da amida foi confirmado pelas correlações entre os prótons metílicos em δ_{H} 3,59 (*trans*) e em 3,22 (*cis*) com os carbonos nas δ_{C} 162,3 (C-8') e 162,9 (C-8), respectivamente. Observou-se também a correlação dos prótons metílicos com os carbonos δ_{C} 117,2 (C-6') e 119,9 (C-6). O espectro HMBC (^1H - ^{15}N) (Fig. 77, p. 120) mostrou correlações dos prótons metílicos e formamida com o nitrogênio em δ 90,2 (N-7) e ainda a correlação dos hidrogênios vinílicos em δ_{H} 7,18 e 7,27 com o nitrogênio em δ 104,3 (N-4), conforme foram exibidas na Figura 70, abaixo.

Figura 70: Importantes correlações observadas nos experimentos de HMBC ^1H - ^{13}C (preto) e ^1H - ^{15}N (azul).



As correlações acima mencionadas foram cruciais na determinação completa da estrutura de S-1, a qual foi estabelecida como 5-oxo-6-(*N*-metilformamida)-4,5- diidro-1,2-ditiol[4,3-*b*]pirrol. Este metabolito secundário foi isolado pela primeira vez em 1969 a partir de uma cultura de *Streptomyces* sp, e teve sua estrutura determinada por cristalografia de raio X (JESSEN, 1969). Neste mesmo ano, Von Daehne *et al*, relatou a atividade antimicrobiana frente a vários micro-organismos para esse composto e seus derivados (VON DAEHNE *et al.*, 1969).



5-Oxo-6-(*N*-metilformamida)-4,5- diidro-1,2-ditiol[4,3-*b*]pirrol

Tabela 12: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C dos metabólitos **S-1a** e **S-1b** em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N-d}_5$

S-1a			S-1b		
C	δ_{C}	δ_{H} (multip, $J_{\text{H,H}}$)	C	δ_{C}	δ_{H} (multip, $J_{\text{H,H}}$)
1	-		1'	-	
2	-		2'	-	
3	110,6	7,27 (s)	3'	110,6	7,27 (s)
3a	141,8		3a'	143,0	
4	-		4'	-	
5	170,3		5'	170,3	
6	119,9		6'	117,2	
6a	136,0		6a'	136,0	
7	-		7'	-	
8	162,9	9,08 (s)	8'	162,3	8,26 (s)
9	30,3	3,29 (s)	9'	34,4	3,57 (s)

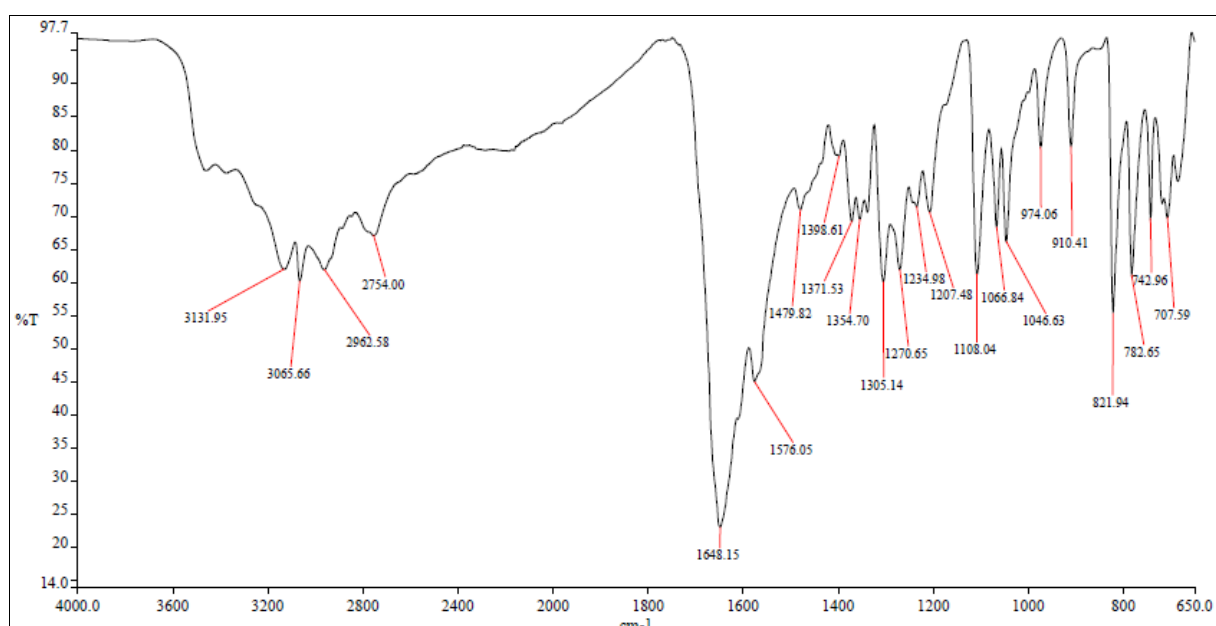
Figura 71: Espectro de absorção na região do infravermelho de S-1

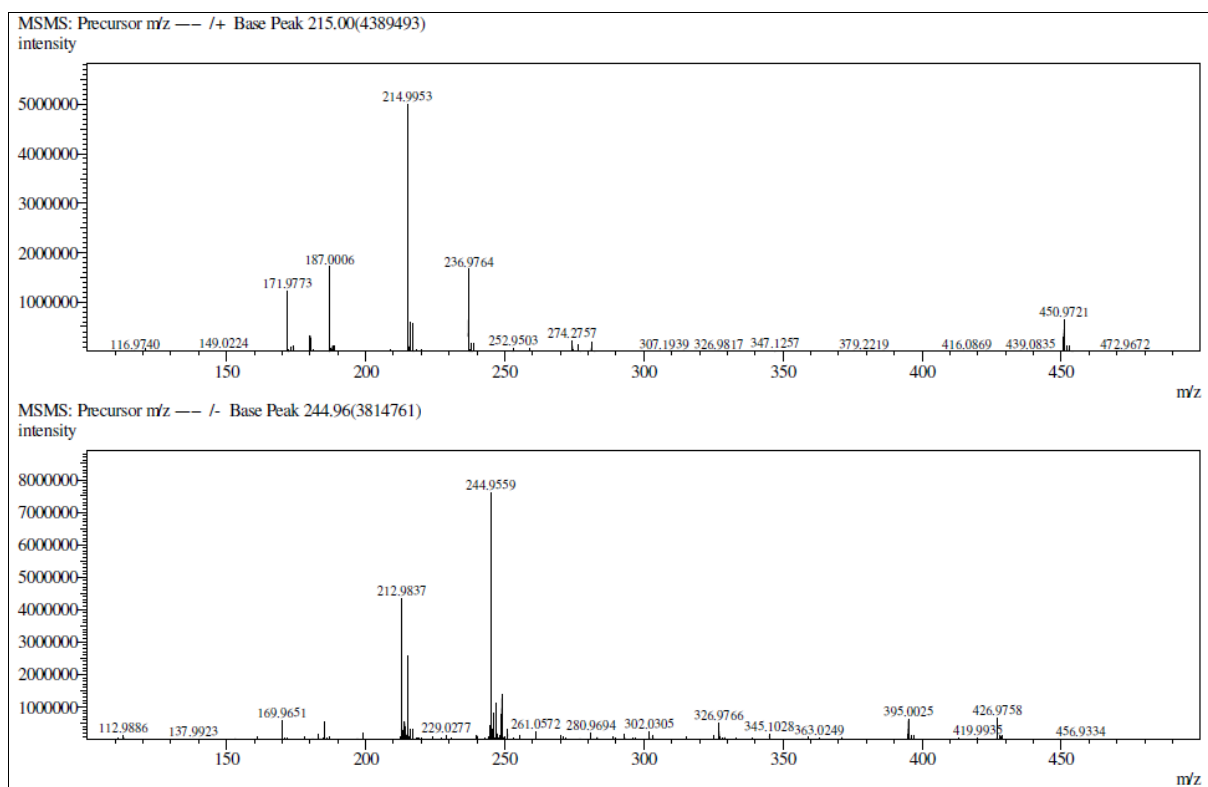
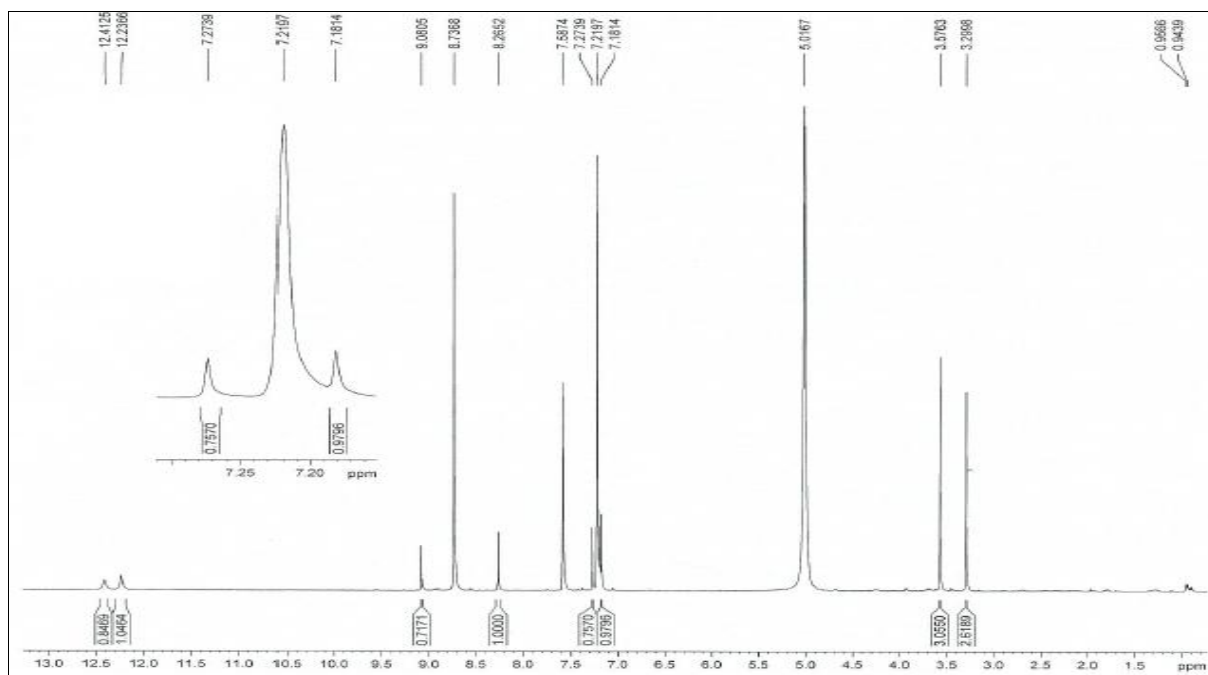
Figura 72: Espectro de massa de alta resolução no modo positivo e negativo de S-1**Figura 73:** Espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de S-1

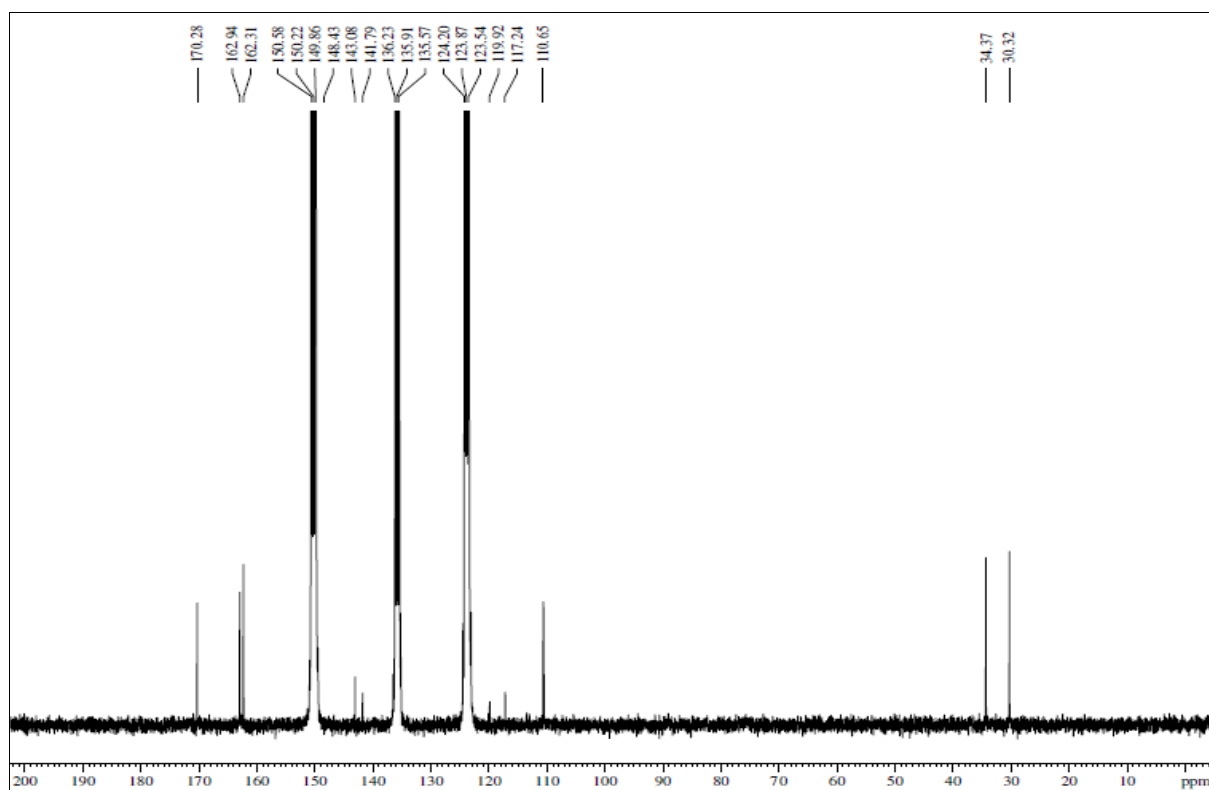
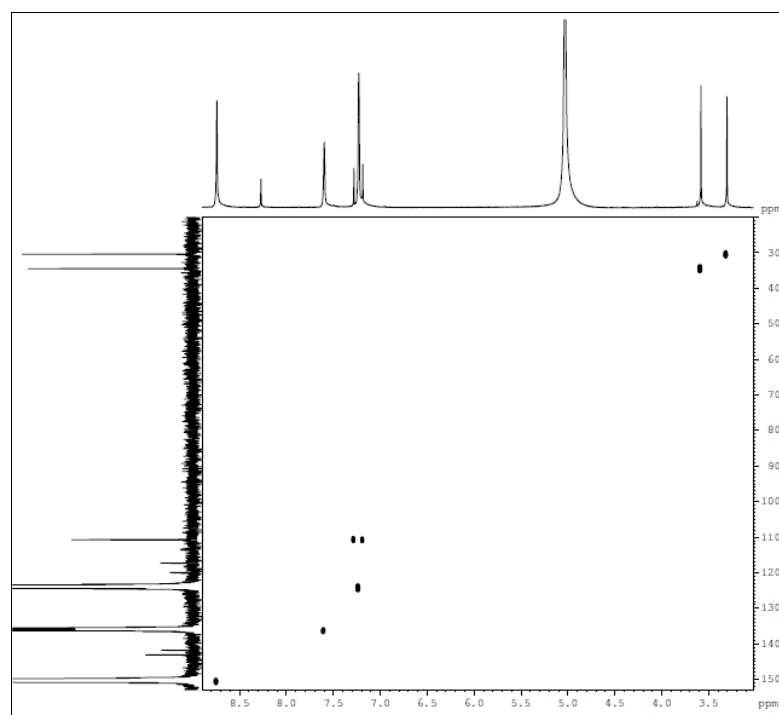
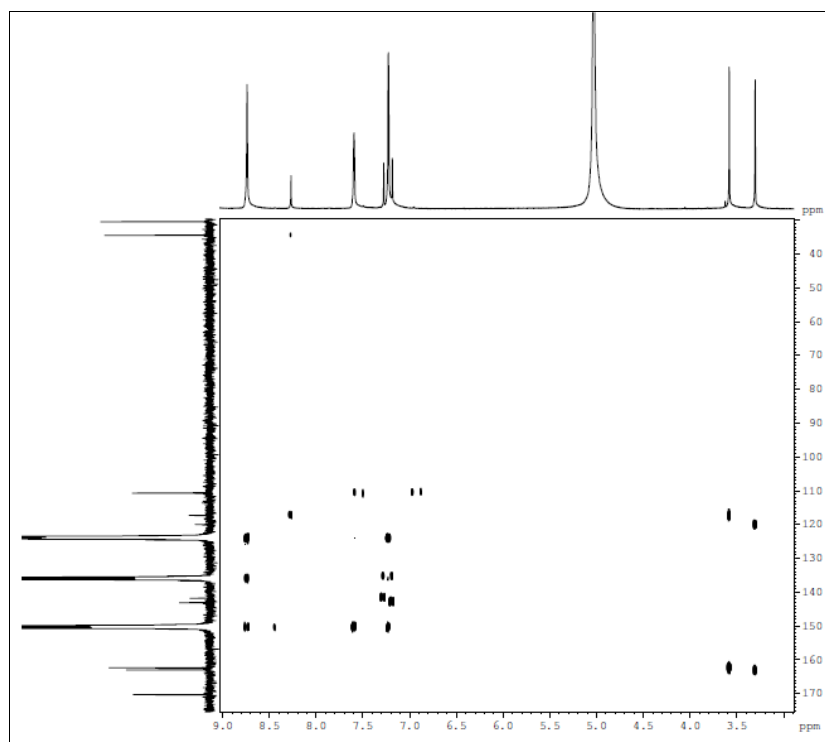
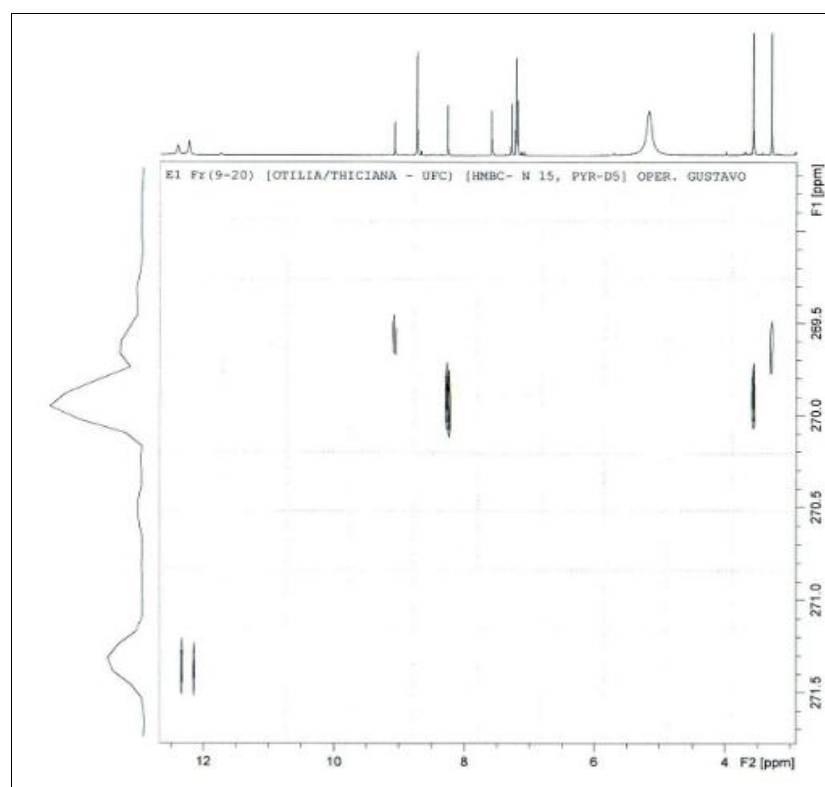
Figura 74: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de S-1**Figura 75:** Espectro de RMN HSQC (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de S-1

Figura 76: Espectro de RMN HMBC ^1H - ^{13}C (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de S-1**Figura 77:** Espectro de RMN HMBC ^1H - ^{15}N (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de S-1

4.3.3 Atividade Biológica

A ditiolpirrolidina, isolada do extrato de *Streptomyces* sp. teve sua atividade citotóxica testada frente a seis linhagens celulares tumorais (Tabela 13), utilizando o ensaio do MTT. As ditiolpirrolidinas são conhecidas de longa data por sua atividade antibiótica, porém existem poucos estudos referentes à sua citotoxicidade em células tumorais (VON DAEHNE, *et al.*, 1979).

Tabela 13: Linhagens celulares tumorais utilizadas nos ensaios de citotoxicidade *in vitro*

Linhagem celular	Prodedência	Tipo Histológico do Câncer/Origem
HCT-116	ATCC	Carcinoma de cólon
OVCAR-8	NCI-USA	Carcinoma ovariano
NCI H358	NCI-USA	Carcinoma bronqueo alveolar
PC-3M	NCI-USA	Carcinoma prostático metastático
HL-60	NCI-USA	Leucemia promielocítica
SF-295	NCI-USA	Glioblastoma

Os valores de CI_{50} determinados são apresentados na Tabela 14. Observa-se que o metabólito avaliado mostrou-se ativo frente a todas as linhagens tumorais testadas. Os melhores resultados foram para as linhagens de próstata metastática (PC-3M), carcinoma de ovário (OVCAR-8) e glioblastoma (SF-295) com IC_{50} de 1,66, 1,05 e 1,52 μ M respectivamente. A atividade foi considerada moderada quando avaliada frente às linhagens de leucemia promielocítica (HL-60) e carcinoma de cólon (HCT-116).

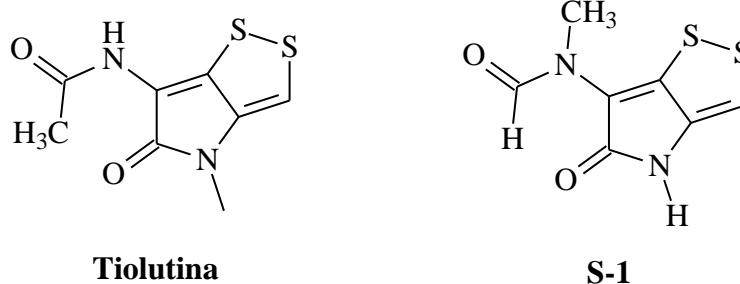
Tabela 14: IC_{50} da ditiolpirrolidina isolada a partir do extrato de *Streptomyces* sp. avaliada em linhagens tumorais pelo teste de MTT. Os resultados apresentados como valores de IC_{50} tem intervalo de confiança de 95% de confiança determinados por regressão não linear pelo programa GraphPad Prism 5.0.

Linhagem celular	HCT-116	OVCAR-8	NCI H358	PC-3M	HL-60	SF-295
μ g/mL	0,490 0,44 – 0,54	0,226 0,18 – 0,27	0,447 0,42 – 0,48	0,356 0,24 – 0,53	1,369 0,78 – 2,38	0,327 0,23 – 0,45
μ M	4,67 2,06 – 2,5	1,05 0,87 – 1,27	2,1 1,9 – 2,2	1,66 1,1 – 2,47	6,39 3,66 – 11,1	1,52 1,09 – 2,12

Outras ditiolpirrolidinas mostraram-se citotóxicas frente a linhagens tumorais humanas, como linhagens de câncer de mama e de cólon (WEBSTER *et al.*, 2000), porém o

conhecimento em relação a atividade antitumoral das ditiolpirrolidinas é relativamente pequeno e, dentre elas, a tiolutina é uma das mais estudadas. A tiolutina é produzida pela bactéria *Streptomyces luteosporus* e é muito semelhante ao metabólito S-1. Além de ser citotóxica para linhagens neoplásicas, essa substância é um potente inibidor de RNA polimerase em bactérias e leveduras. Outros estudos indicam ainda que essa substância tem efeitos preventivos na malignização das células, como a supressão da angiogênese (JIMENEZ *et al.*, 1973; TIPPER, 1973; WEBSTER *et al.*, 2000; FOLKMAN, 2002).

Figura 78: Comparação entre a tiolutina e do metabólito S-1



Em 2007, Li e colaboradores realizaram substituições aromáticas no nitrogênio do anel pirrólico de uma ditiolpirrolidina isolada de *Xenorhabdus* sp. com o intuito de observar alterações relacionadas à estrutura e atividade se depararam com o aumento da citotoxicidade contra células de câncer de pulmão.

Atualmente, estudos sobre o mecanismo de ação dessa substancia estão sendo realizados pela aluna de mestrado Paula Abreu, sob a orientação da Profa. Dr. Letícia Costa Lotufo.

4.4 *Kocuria* sp.

O extrato metanólico da bactéria marinha *Kocuria* sp., isolada a partir de uma esponja marinha, coletada no arquipélago de Flórida Keys (EUA), foi fracionado usando cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE, proporcionando o isolamento do tiopeptídeo K-1.

4.4.1 *Determinação estrutural de K-1*

O composto nomeado K-1 (1,4 mg), foi isolado a partir da fração F-8 do extrato metanólico da bactéria marinha *Kocuria* sp. (item 5.4.4, p. 151), utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Este metabólito apresentou-se como um sólido amorfo branco, com rotação específica de $[\alpha]_D^{30} + 27,03$ (*c* 0.108, CHCl₃:CH₃OH 1:1).

O espectro de absorção na região do IV (Fig. 88, p. 134) apresentou absorção centrada em 3342 cm⁻¹, associada à vibração de estiramento de ligação N-H, absorções em 1649 e 1512 cm⁻¹, relativas à bandas de amida I e II, respectivamente. A banda de amida I refere-se à vibração de estiramento da ligação C=O, enquanto a banda de amida II é devido a vibração de deformação angular da ligação N-H fortemente ligada ao estiramento da ligação C-N.

O espectro de massas de alta resolução de K-1 IES-EM (Fig. 89, p. 134), apresentou íon correspondente à molécula protonada $[M + H]^+$ em *m/z* 1515,3733 (calculado *m/z* 1515,3739) e $[M + 2H]^+$ em *m/z* 758,1914 (calculado *m/z* 758.19085), condizente com a fórmula molecular C₆₉H₆₆N₁₈O₁₃S₅. Por meio desta fórmula foi possível calcular quarenta e seis graus de insaturação para a molécula.

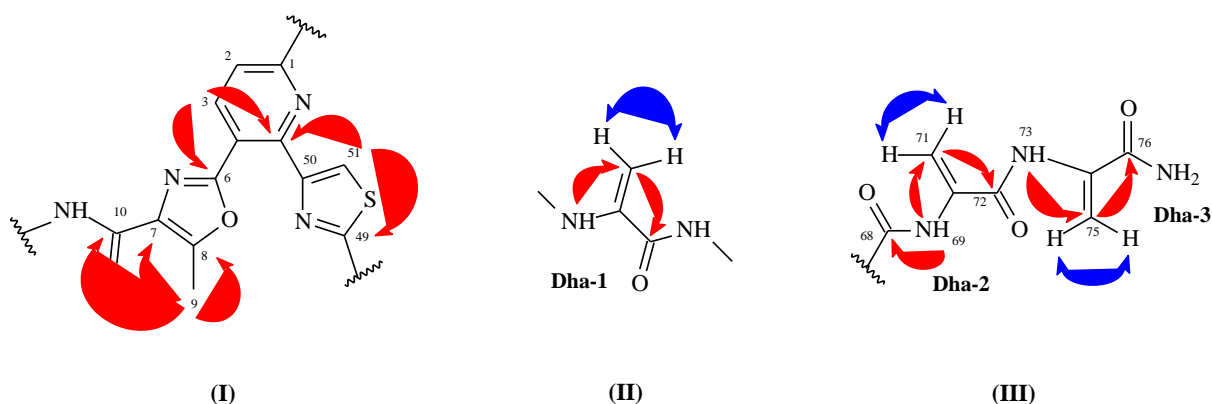
No espectro de RMN ¹H [500 MHz, CDCl₃] (Figs. 90 e 91, p. 135) observou-se a presença de simpletos em δ_H 7,45 (H-48), 7,86 (H-17), 8,01 (H-51) e 8,09 (H-54) compatíveis com a presença de quatro anéis tiazólicos dissustituídos e dois sinais dupletos em δ_H 8,24 (H-3) e 8,36 (H-2) caracterizando a presença de um anel piridínico trissustituído. Na região de hidrogênios aromáticos foram observados sinais para o aminoácido tirosina (Tyr) em δ_H 6,45 (d, 2H, *J*=8,2 Hz) e 6,60 (d, 2H, *J*=8,2 Hz) e para o aminoácido fenilalanina (Phe) em δ_H 7,17 (t, *J*=7,8 Hz), 7,23 (d, 2H, *J*=7,8 Hz) e 7,28 (t, 2H, *J*=7,8 Hz). Três resíduos do aminoácido não muito comum diidroalanina (Dha) foram caracterizados pelos pares de hidrogênios metilênicos em δ_H 5,52/6,69, 5,48/6,54 e 5,38/6,58 ppm. Um resíduo de alanina (Ala) foi confirmado pelo sinal de metila duplete em δ_H 1,55 (d, 3H, *J*=6,8 Hz), pelo sinal de

NH em δ_H 7,44 (d, $J=7,4$ Hz) e pelo hidrogênio metínico em δ_H 4,90 (m). Outros sinais identificados no espectro de RMN 1H confirmaram a presença de uma unidade de asparagina (Asn) em δ_H 8,65 (d, $J=9,7$ Hz); 4,90 (m); 2,16 (m) e 0,50 (dd, $J=17,4$ e 3,0 Hz), duas prolinas (Pro) e um anel tiazolina em δ_H 4,83 (ddd, $J=13,3$; 8,7 e 2,6 Hz); 3,76 (m) e 3,58 (m). A identificação desses aminoácidos, juntamente com a presença de cinco átomos de enxofre na fórmula molecular de K-1, permitiram inferir que o composto em discussão se trata de um peptídeo contendo anéis tiazólicos em sua estrutura.

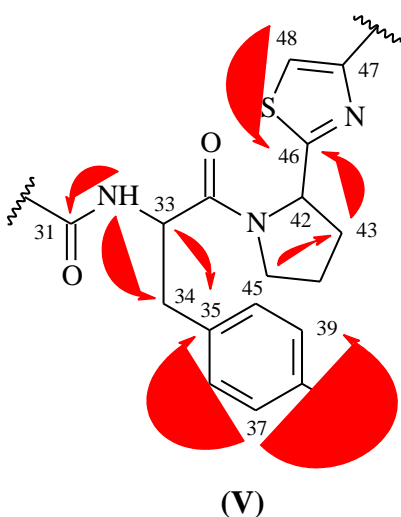
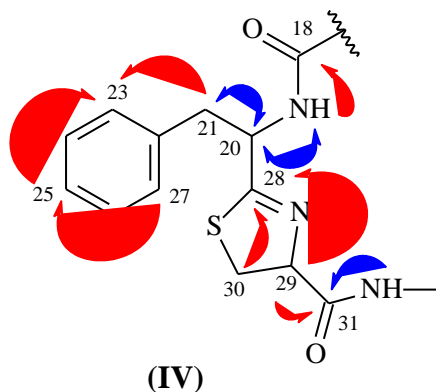
O espectro de RMN ^{13}C -CPD [125 MHz, $CDCl_3$] (Fig. 92, p. 136), apresentou 62 linhas espectrais, onde os carbonos em δ_C 172,3; 131,1; 129,9; 128,4 e 117,6 mostraram sobreposição de sinais. O padrão de hidrogenação foi determinado pelo experimento bidimensional HSQC- editado (Fig. 93, p. 136) o qual foi importante para atribuir de forma inequívoca os hidrogênios metínicos e metilênicos. Foram observados dois carbonos metílicos em δ_C 12,3 (C-6) e 18,6 (C-77), treze carbonos metilênicos, sendo os sinais em δ_C 102,8 (C-58), 103,6 (C-71) e 103,5 (C-75) referentes a carbonos sp^2 e vinte e dois carbonos metínicos. Por subtração com o espectro de RMN ^{13}C foi possível contabilizar trinta e dois carbonos não hidrogenados.

Uma vez que todas as subunidades presentes na estrutura do peptídeo foram identificadas, a sequência dos aminoácidos foi determinada pela análise das correlações principais observadas nos experimentos HMBC (Figs. 94 a 95, p. 137), COSY (Fig. 96, p. 138) e TOCSY (Fig. 97, p. 138).

Um anel residual metiloxazol foi confirmado na estrutura de K-1 pela presença de um grupo metila simpleto em δ_H 2,88 que mostrou correlação com os carbonos em δ_C 129,9 (C-7), 155,8 (C-8) e 163,1 (C-10, correlação fraca a 4 ligações), como mostrado na subestrutura I (Fig. 79, p. 125). Correlações observadas do anel piridínico trissubstituído também estão representadas nesta subestrutura. As subestruturas II e III, na mesma figura, mostram as correlações observadas nos experimentos TOCSY e HMBC, confirmando três resíduos do aminoácido Dha, denominados de Dha-1, Dha-2 e Dha-3.

Figura 79: Correlações exibidas nos experimentos HMBC e TOCSY para K-1

O experimento COSY exibiu correlações do hidrogênio metínico em δ_H 5,13 (H-20) com o NH em δ_H 8,35 (NH-19) e com os hidrogênios metilênicos em δ_H 3,36 e 3,58 (H-21), mostradas na subestrutura IV. O acoplamento desses hidrogênios metilênicos com os carbonos aromáticos C-23 e C-27 (δ_C 129,9), exibidos no HMBC, comprovaram a presença do aminoácido Phe. Ainda na subestrutura IV são encontradas as correlações do hidrogênio metínico em δ_H 4,83 (H-29) e dos hidrogênios metilênicos em δ_H 3,73 e 3,58 (H-30) com o carbono em δ_C 172,9 (C-28), sugerindo que um resíduo do aminoácido Cya foi modificado pela inclusão do heterociclo tiazol. Outras correlações observadas no experimento HMBC são exibidas nessa subestrutura.



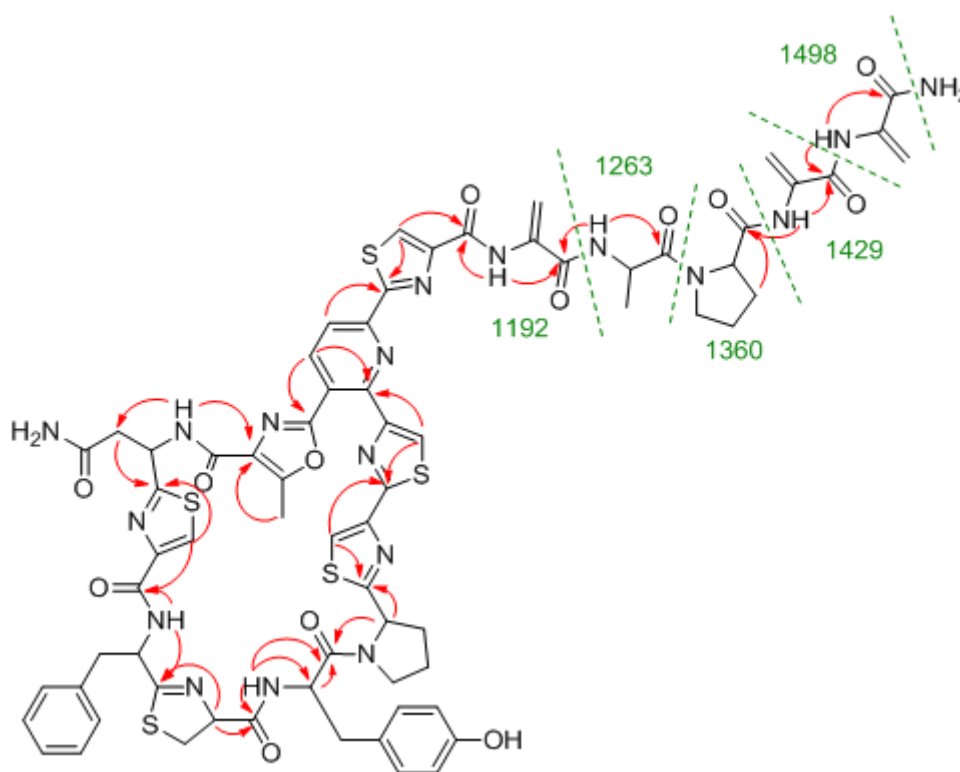
A presença dos aminoácidos Tyr e Pro-1 pode ser comprovada na subestrutura V, pelos acoplamentos observados nos experimentos TOCSY e HMBC. Observou-se uma modificação no aminoácido residual da Pro-1 para formação de um anel aromático tiazol, comprovado pelo acoplamento dos hidrogênios δ_H 5,33 (t, $J = 7.5$ Hz), 2,58 (m), 2,07 (m) e 7,45 (s) com o carbono em δ_C 173,5 (C-46),

em substituição ao acoplamento com um carbono carbonílico característico dos aminoácidos.

As correlações observadas no experimento HMBC também mostraram que o anel piridínico foi cercado pelos anéis tiazol e metiloxazol o que permitiu estabelecer uma estrutura planar para o peptídeo. Adicionalmente, foi realizada uma análise dos fragmentos principais observados no espectro MS/MS (Fig. 87, p. 132) da molécula para apoiar a sequência determinada por HMBC. Assim, a sequência de Dha-3/Dha-2/Pro-2/Ala para a cadeia lateral de aminoácidos foi determinada a partir dos fragmentos em m/z 1498, 1429, 1360, 1263 e 1192.

A interpretação dos dados espectroscópicos de K-1 permitiu determinar que a biomolécula em discussão trata-se de um novo peptídeo, nomeado como Kocurina. A Figura 80 mostra a estrutura estabelecida para o peptídeo, bem como as principais correlações observadas no HMBC e os fragmentos fornecidos pelo espectro de massas MS/MS.

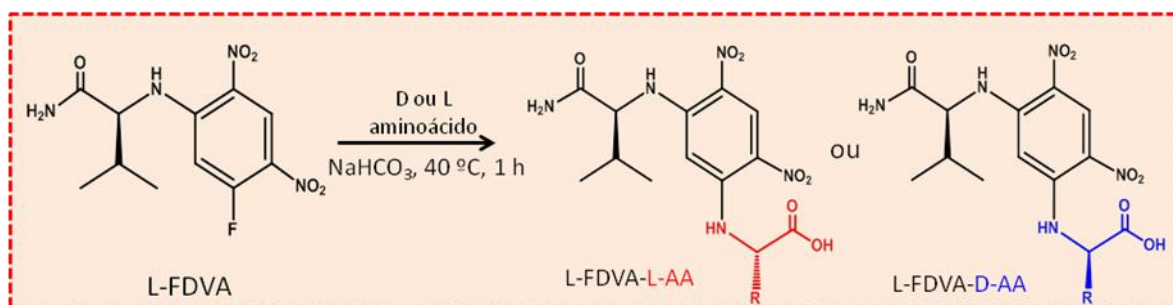
Figura 80: Principais correlações exibidas no experimento HMBC e fragmentos fornecidos pelo espectro de massa para Kocurina



A configuração absoluta dos resíduos de aminoácidos de Kocurina foi determinada pela aplicação da metodologia de Marfey's (MARFEY, 1984). A análise consiste em obter os aminoácidos presentes no peptídeo em sua forma livre através das reações de hidrólise e,

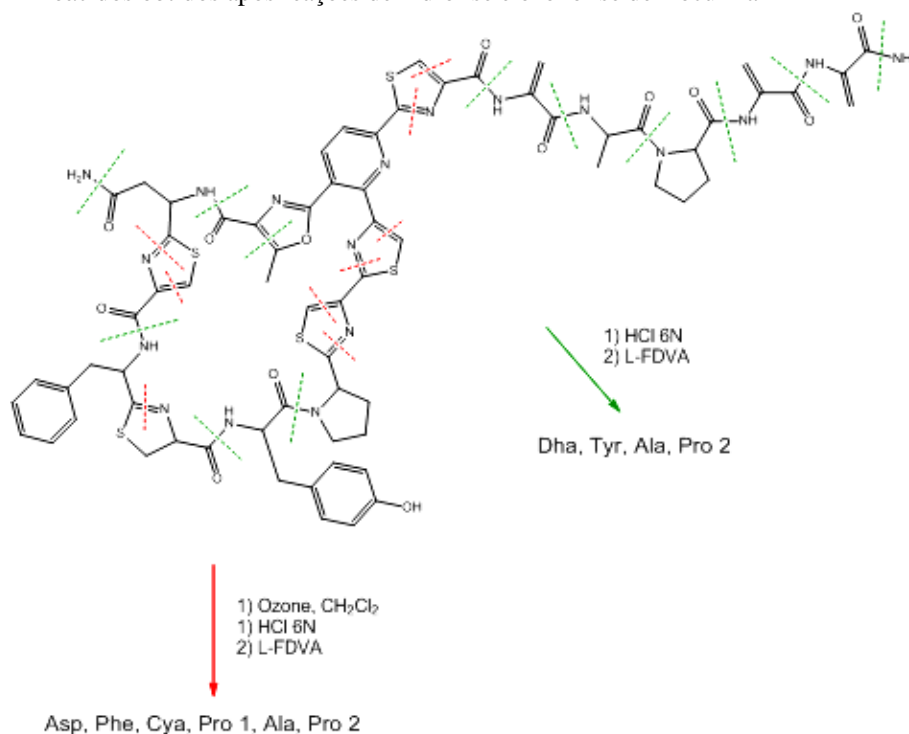
posteriormente, reagi-los com 1-fluor-2,4-dinitrofenil-5-L-valinamida (L-FDVA), conforme mostra a Figura 81. Os aminoácidos derivatizados são analisados por LC/MS e seus tempos de retenções são comparados com padrões D e L de aminoácidos derivatizados.

Figura 81: Reação de derivatização dos aminoácidos (L) ou (D) com reagente de Marfey (L)



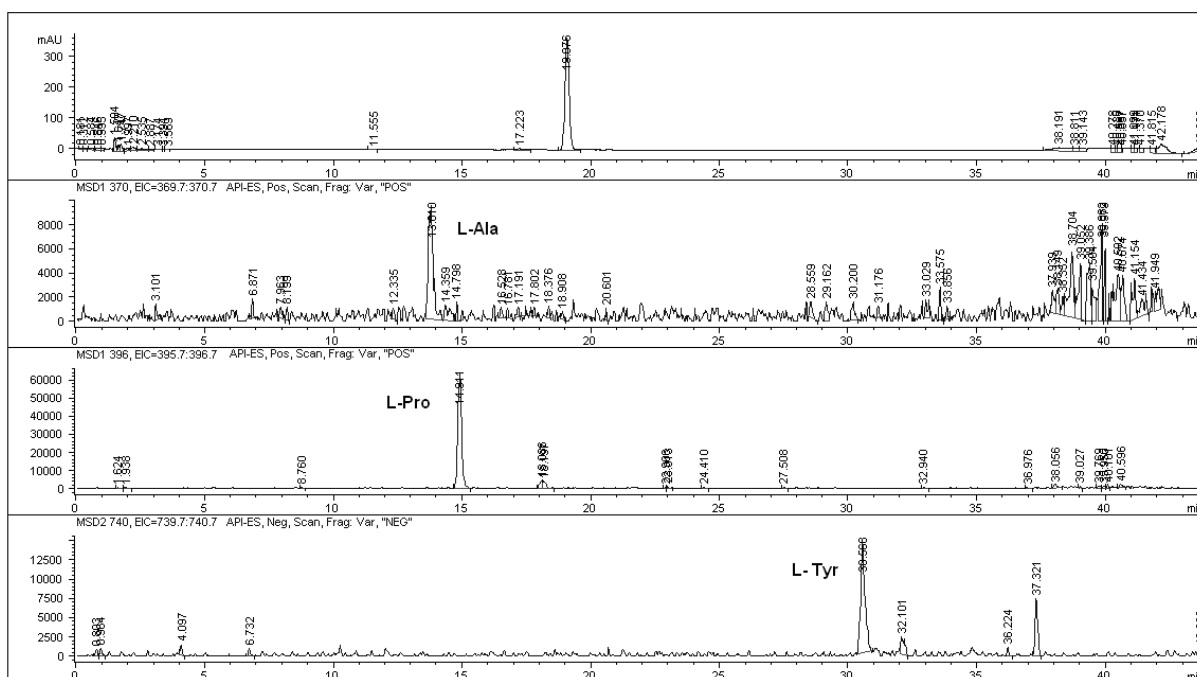
É conhecido que para peptídeos contendo anéis oxazóis e tiazóis uma hidrólise ácida direta resultaria apenas na clivagem dos anéis oxazóis. Com a finalidade de liberar os aminoácidos adjacentes aos anéis tiazóis é necessário realizar uma reação de ozonólise antes da hidrólise (LININGTON, *et al.*, 2007). A Figura 82 mostra os aminoácidos livres obtidos após a reação de hidrólise e da reação de ozonólise seguida de hidrólise para Kocurina.

Figura 82: Aminoácidos obtidos após reações de hidrólise e ozonólise de Kocurina



A amostra hidrolisada com HCl 6 N (110 ° C, 24 h) após derivatização com L-FDVA revelou a presença de L-Tyr, L-Pro (Pro-1) e L-Ala, com base em comparação dos seus tempos de retenção com os de padrões derivatizados. A Figura 83 abaixo mostra o cromatograma de kocerina hidrolisado e derivatizado no modo positivo, bem como a extração de íons para os aminoácidos Ala, Pro e Tyr. O aminoácido Dha não foi analisado.

Figura 83: Cromatograma de Kocerina hidrolisado e derivatizado



O tratamento de uma solução de Kocerina em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ com ozônio durante 10 minutos, seguido por hidrólise ácida com HCl 6 N (110 ° C, 24 h) e derivatização com L-FDVA permitiu identificar L-Asp, L-Phe, L-Cya, L-Pro (Pro-2) e L-Ala como componentes do peptídeo (Fig. 84, p. 129). Tyr não foi encontrado nesta segunda análise, provavelmente devido à sua decomposição durante a ozonólise do peptídeo. Observa-se também a conversão dos aminoácidos asparagina e cisteína em ácido aspártico (Asp) e ácido cisteico (Cya), respectivamente, devido a reação de hidrólise. A Tabela 15 (p. 129) abaixo mostra os tempos de retenção para os aminoácidos e padrões utilizados.

Figura 84: Cromatograma de kocerina após reação de ozonólise seguida de hidrólise e derivatização com reagente de Marfey's

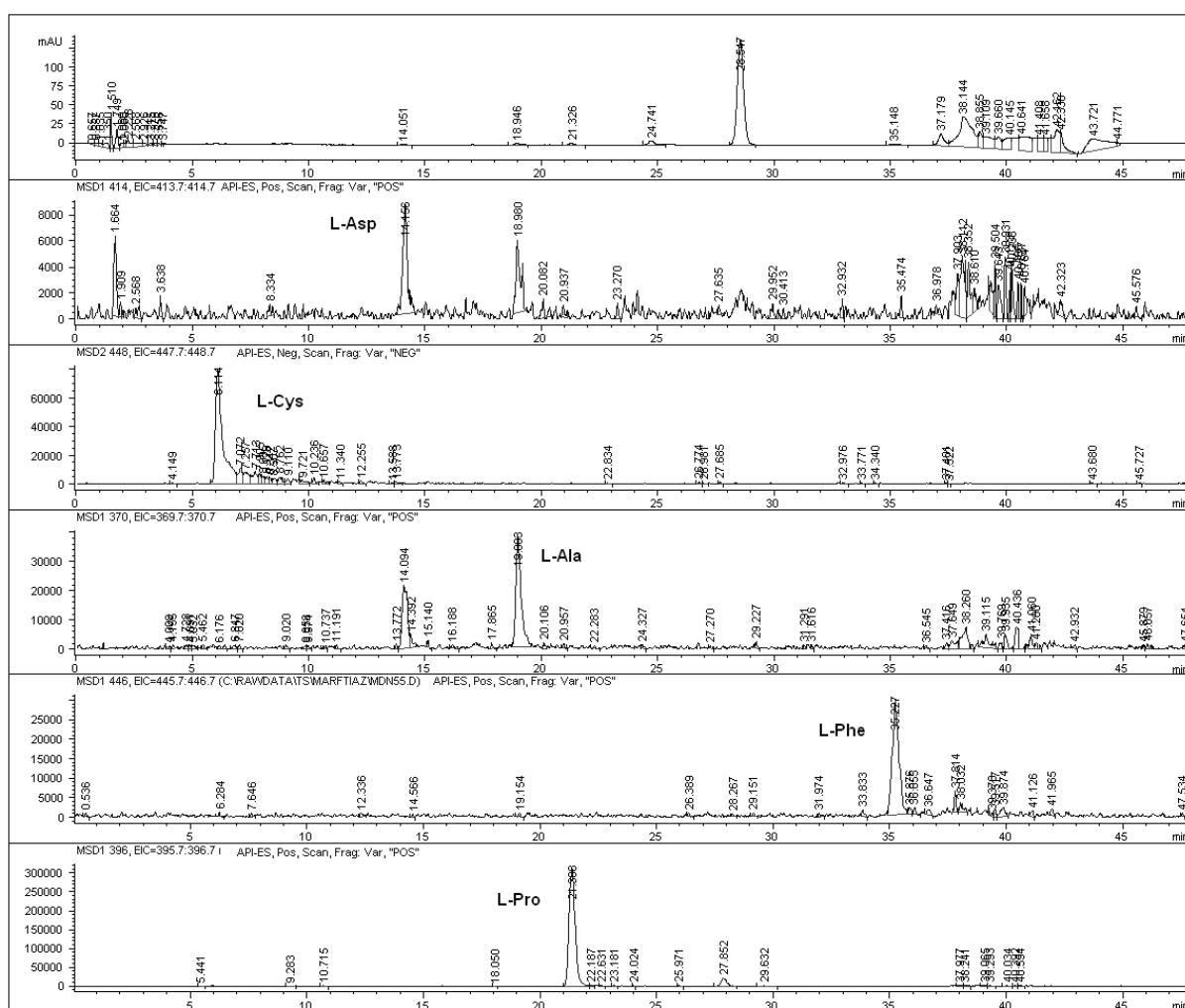
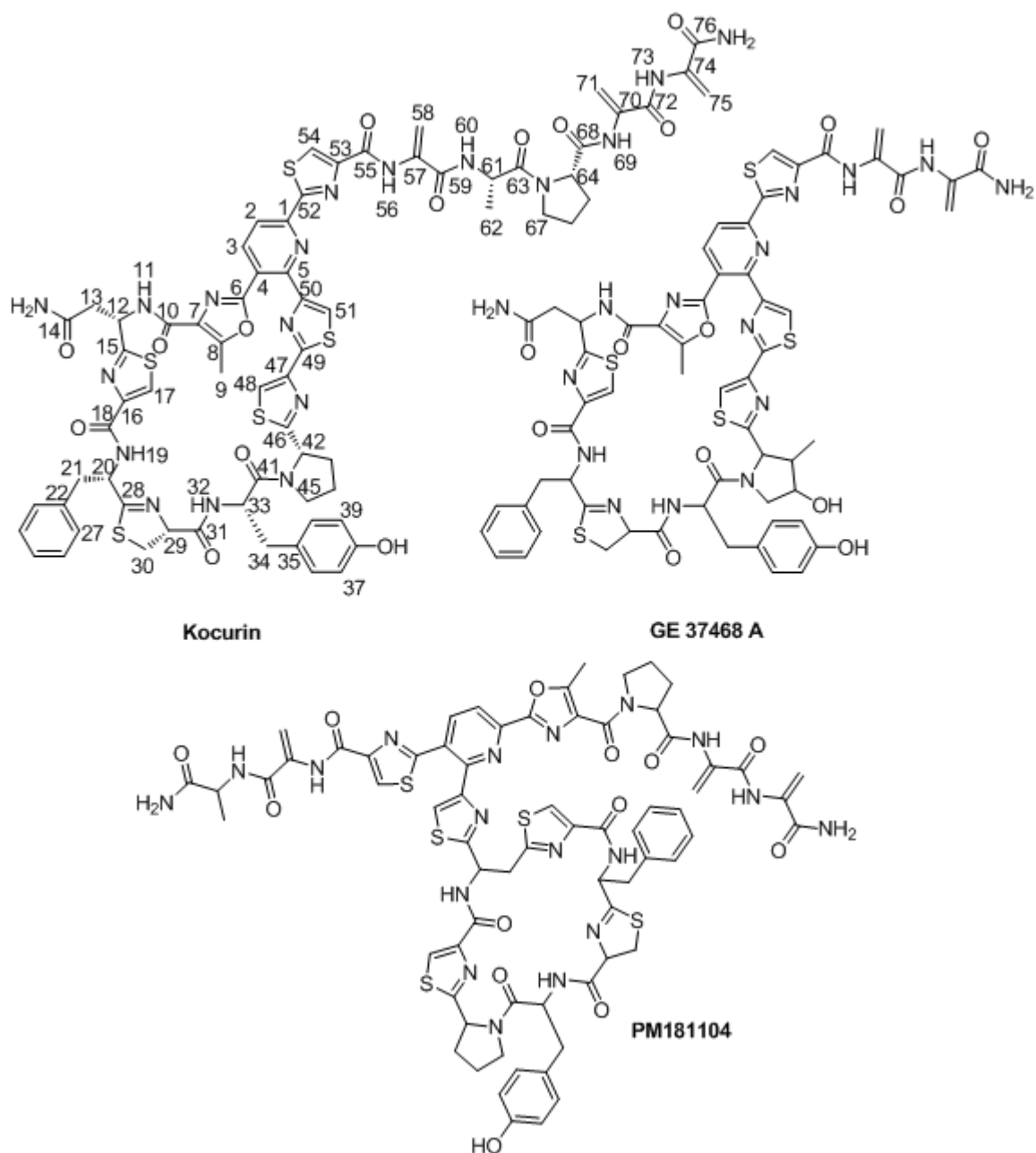


Tabela 15: Tempos de retenção observados para os aminoácidos livres de Kocerina e dos padrões utilizados na análise de Marfey's

Análise de Marfey's			
Aminoácidos	t_R (min) Kocerina	t_{RL} (min) Padrao L	t_{RD} (min) Padrao D
Hidrólise			
Alanina	13,7	13,8	18,3
Prolina	14,9	14,9	18,1
Tirosina	30,5	30,6	34,8
Ozonólise			
Ácido aspartico	14,1	14,1	16,4
Ácido cistéico	6,1	5,7	-
Alanina	19,0	19,0	28,5
Fenilalanina	35,2	34,6	37,8
Prolina	21,4	20,8	27,3

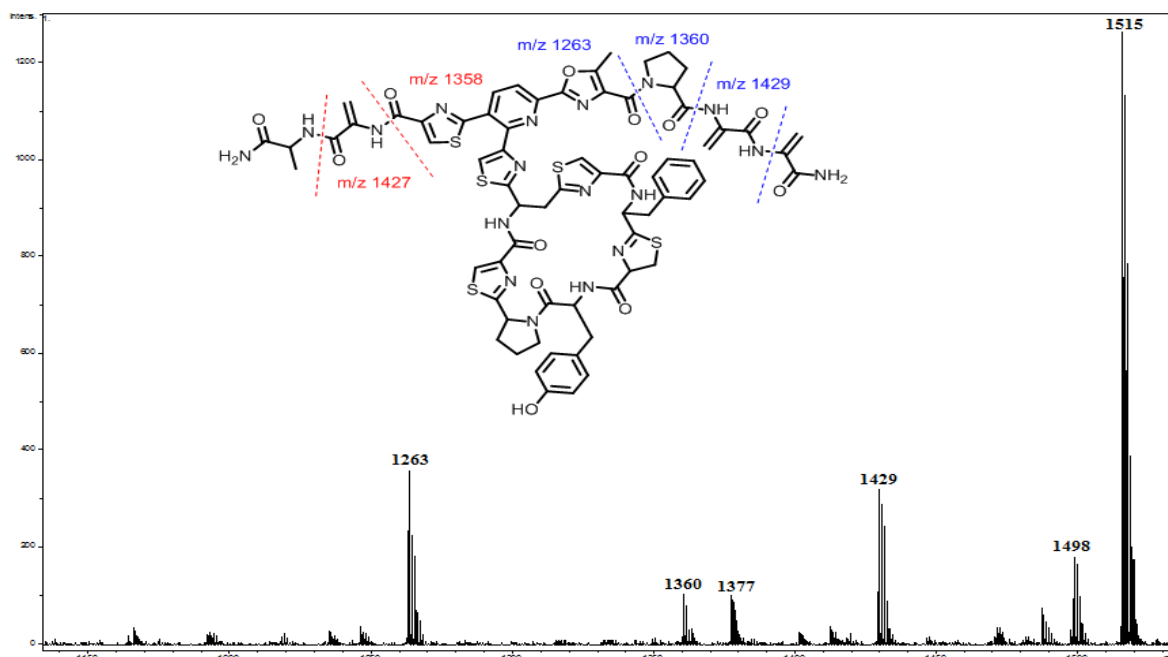
Figura 86: Estruturas de kocurina, do antibiótico GE 37468 A e do peptídeo antibacteriano PM181104

Uma patente dos EUA descreve um peptídeo antibacteriano PM181104 (Fig 86), isolado do derivado marinho *Kocuria* sp. (ZMA B-1/MTCC 5269), com a mesma fórmula molecular, contudo com uma estrutura planar diferente de kocurina (MAHAJAN *et al*, 2009). Embora nenhuma explicação seja dada na patente sobre o mecanismo seguido na elucidação estrutural de PM181104, acreditamos que kocurina e PM181104 são a mesma molécula. Em ambas as estruturas, são identificados os mesmos resíduos de aminoácidos, contudo,

acreditamos que houve erros de interpretação espectroscópica para a estrutura proposta para PM181104, e que o composto real isolado no trabalho descrito na patente tem a estrutura aqui proposta para kocurina.

Uma inconsistência na estrutura proposta para o composto PM181104 é a presença de duas cadeias laterais de aminoácidos. Devido a isto, o padrão de fragmentação MS/MS gerado por este composto deveria conter íons adicionais aos observados para kocurina, originados por perdas de aminoácidos de ambas as cadeias laterais. Entre outros, um íon em m/z 1427 referente a eliminação do resíduo de alanina terminal, deveria aparecer no espectro MS/MS da molécula e não é observada no espectro de kocurina (Fig. 87).

Figura 87: Espectro MS/MS de Kocurina



Infelizmente, nenhuma fragmentação MS/MS de PM181104 é relatada na patente e apenas o íon referente ao peso molecular do composto é incluído como parte da informação estrutural. Uma comparação do espectro de RMN ^1H em DMSO- d_6 de kocurina com o descrito na patente de PM181104, confirma que ambas as moléculas são idênticas. A Tabela 16 (p. 133) mostra os dados de RMN ^1H e ^{13}C para kocurina.

Tabela 16: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, CDCl_3) para Kocurina

Nº	δ (C)	δ (H), (Multiplicidade, J)	δ (C)	δ (H) (Multiplicidade, J)
1	150,8		39	117,6
2	138,6	8,36 (d, 8,2 Hz)	40	131,1
3	118,6	8,24 (d, 8,2 Hz)	41	170,5
4	122,5		42	61,7
5	151,4		43	34,2
6	155,8		44	25,7
7	129,9		45	48,2
8	154,2		46	173,5
9	12,1	2,88 (s, 3H)	47	148,6
10	163,1		48	114,0
11		8,65 (d, 9,7 Hz)	49	159,7
12	47,7	4,90 (m)	50	154,2
13	37,6	2,16 (m) 0,50 (dd, 17,4 e 3,0 Hz)	51	122,5
14	172,3		52	167,9
15	171,9		53	151,4
16	149,0		54	127,0
17	122,4	7,86 (s)	55	159,4
18	160,3		56	
19		8,35 (d, 6,4 Hz)	57	133,9
20	53,5	5,13 (m)	58	102,8
21	39,0	3,58 (m) 3,36 (dd, 14,0 e 3,1 Hz)	59	163,1
22	135,7		60	
23	129,9	7,23 (d, 7,8 Hz)	61	47,6
24	128,4	7,28 (t, 7,8 Hz)	62	18,4
25	127,2	7,17 (t, 7,8 Hz)	63	172,3
26	128,4	7,28 (t, 7,8 Hz)	64	61,1
27	129,9	7,23 (d, 7,8 Hz)	65	27,8
28	172,9		66	25,1
29	78,3	4,83 (ddd, 13,3, 8,7 e 2,6)	67	47,3
30	35,9	3,76 (m); 3,58 (m)	68	169,6
31	169,1		69	
32		7,40 (d, 9,3 Hz)	70	134,4
33	51,4	5,21(m)	71	103,6
34	36,4	3,14 (dd, 14,1 e 3,0 Hz) 2,94 (dd, 14,1 e 4,5 Hz)	72	162,0
35	125,6		73	
36	131,1	6,60 (d, 8,2 Hz)	74	132,9
37	117,6	6,45 (d, 8,2 Hz)	75	103,5
38	155,6		76	165,3

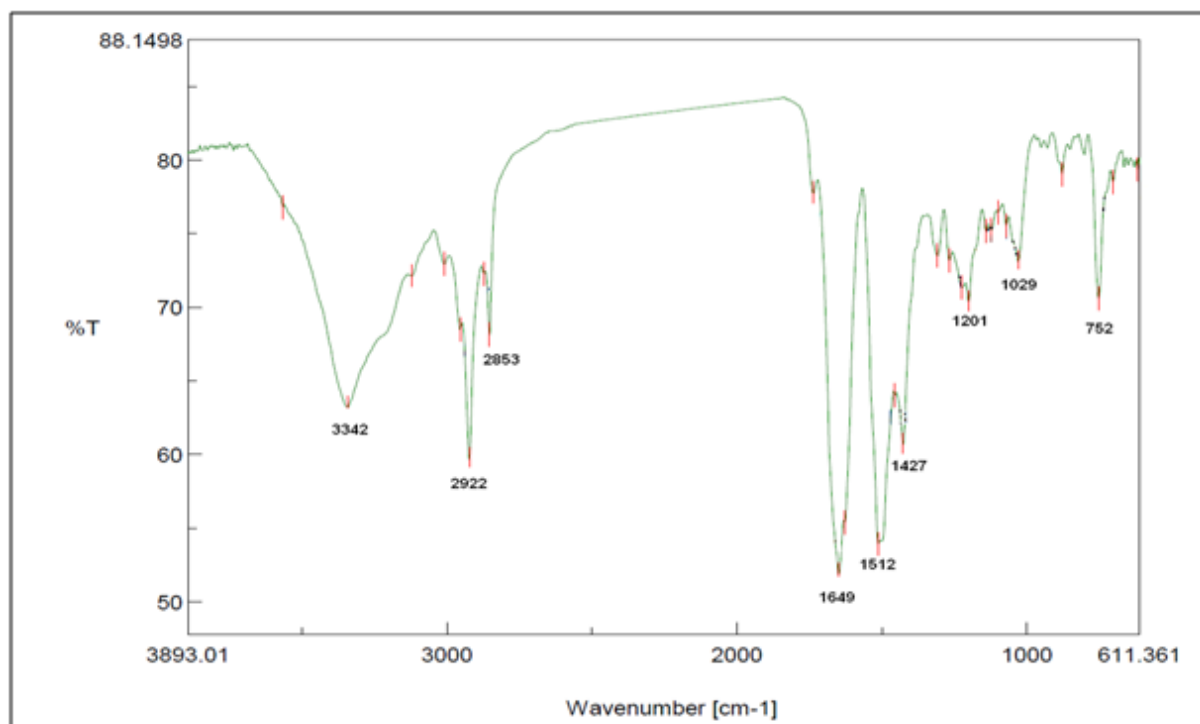
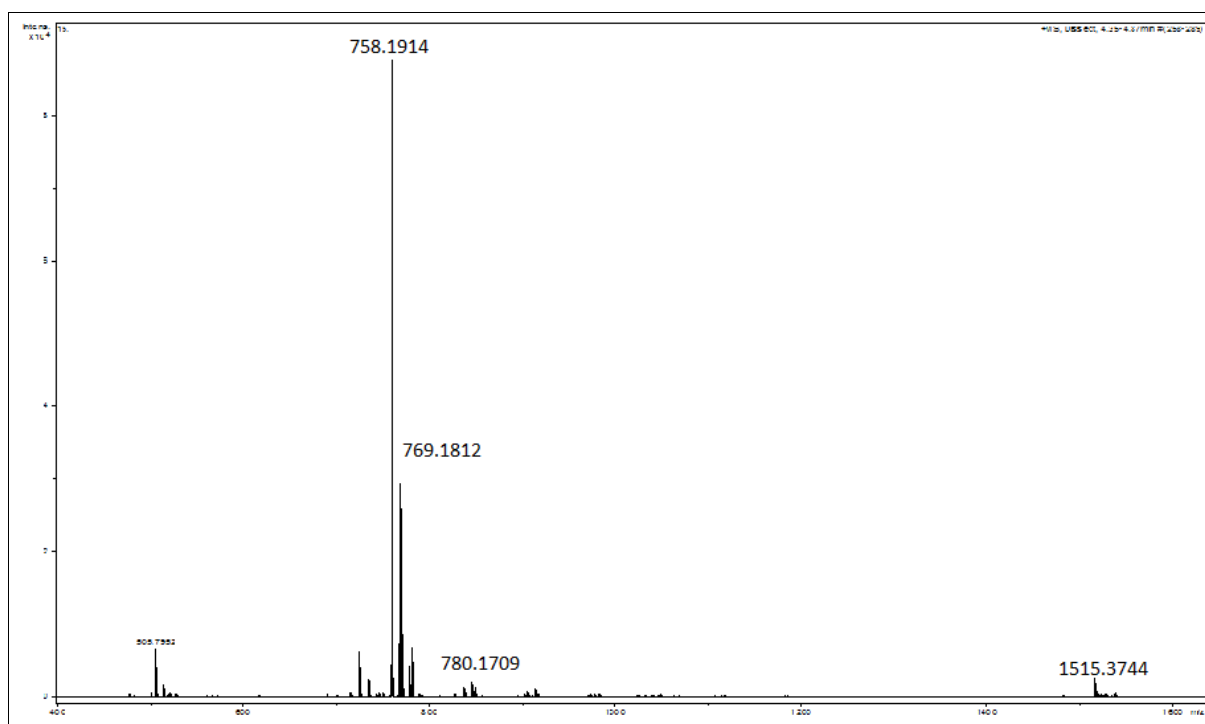
Figura 88: Espectro de absorção na região do infravermelho de K-1**Figura 89:** Espectro de massa de alta resolução de K-1

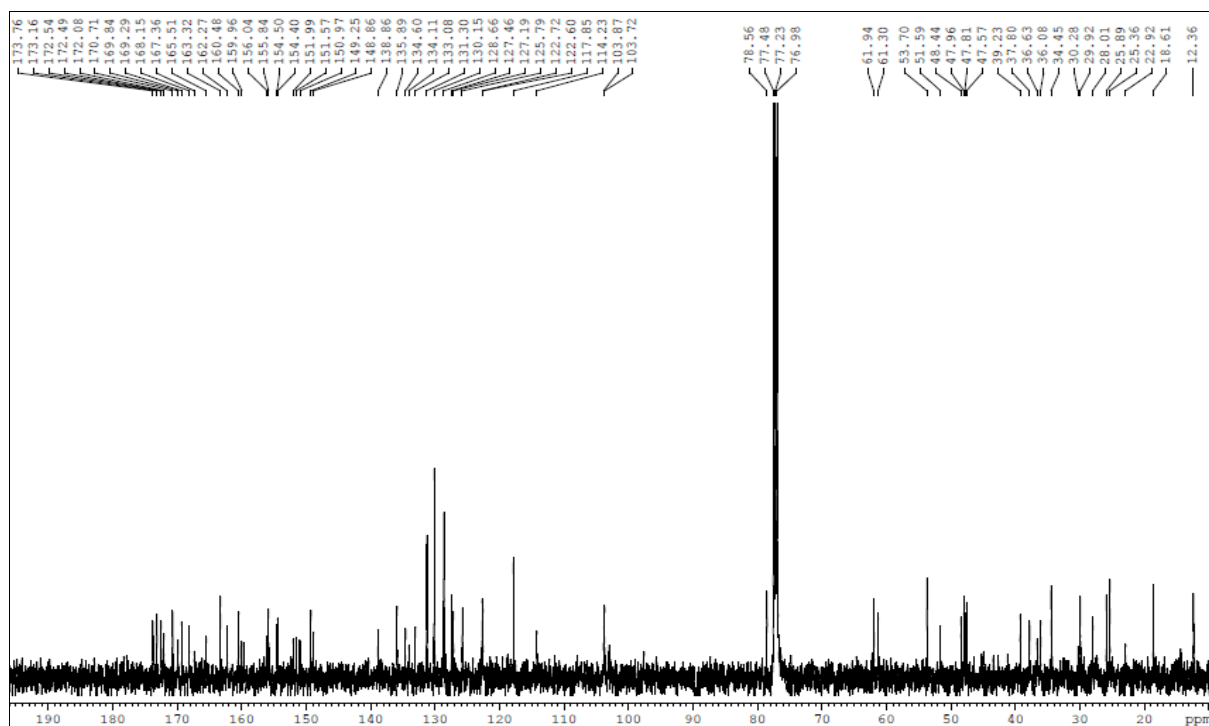
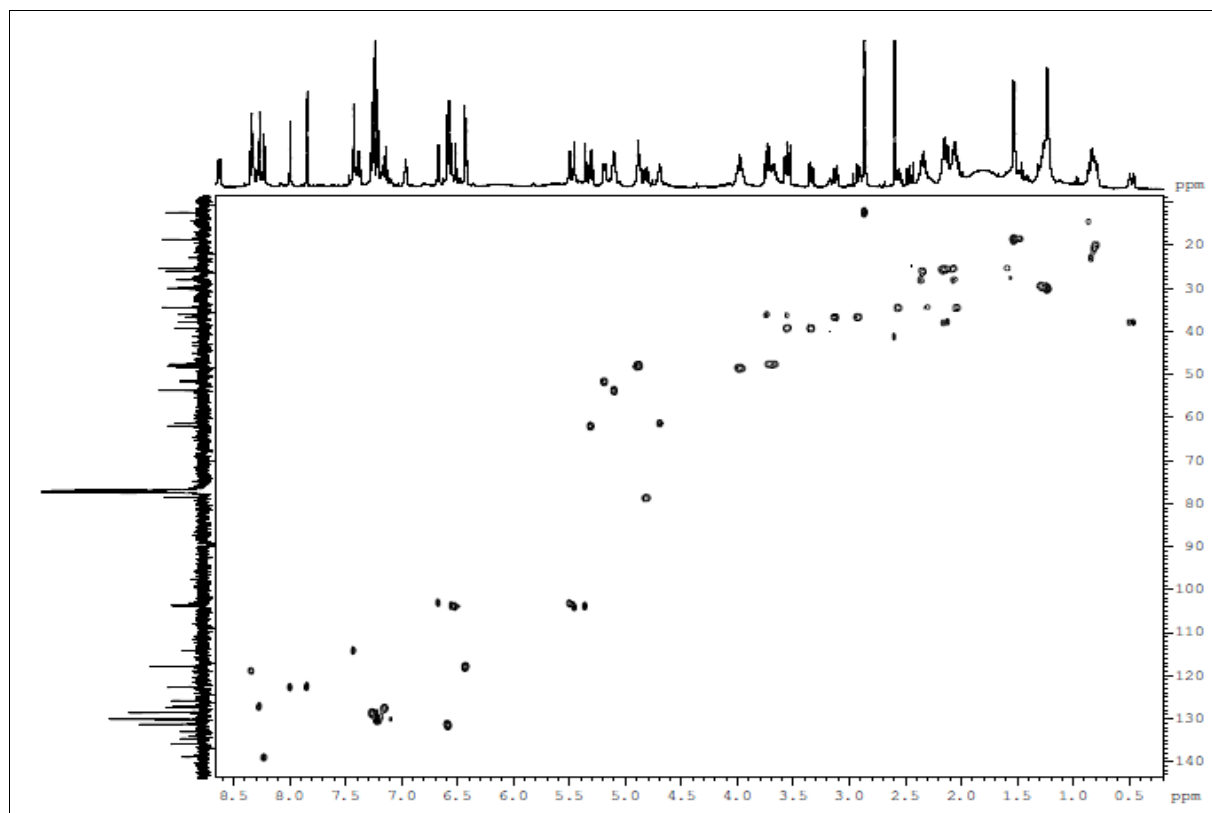
Figura 92: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de K1**Figura 93:** Espectro de RMN HSQC (125 MHz, CDCl_3) de K1

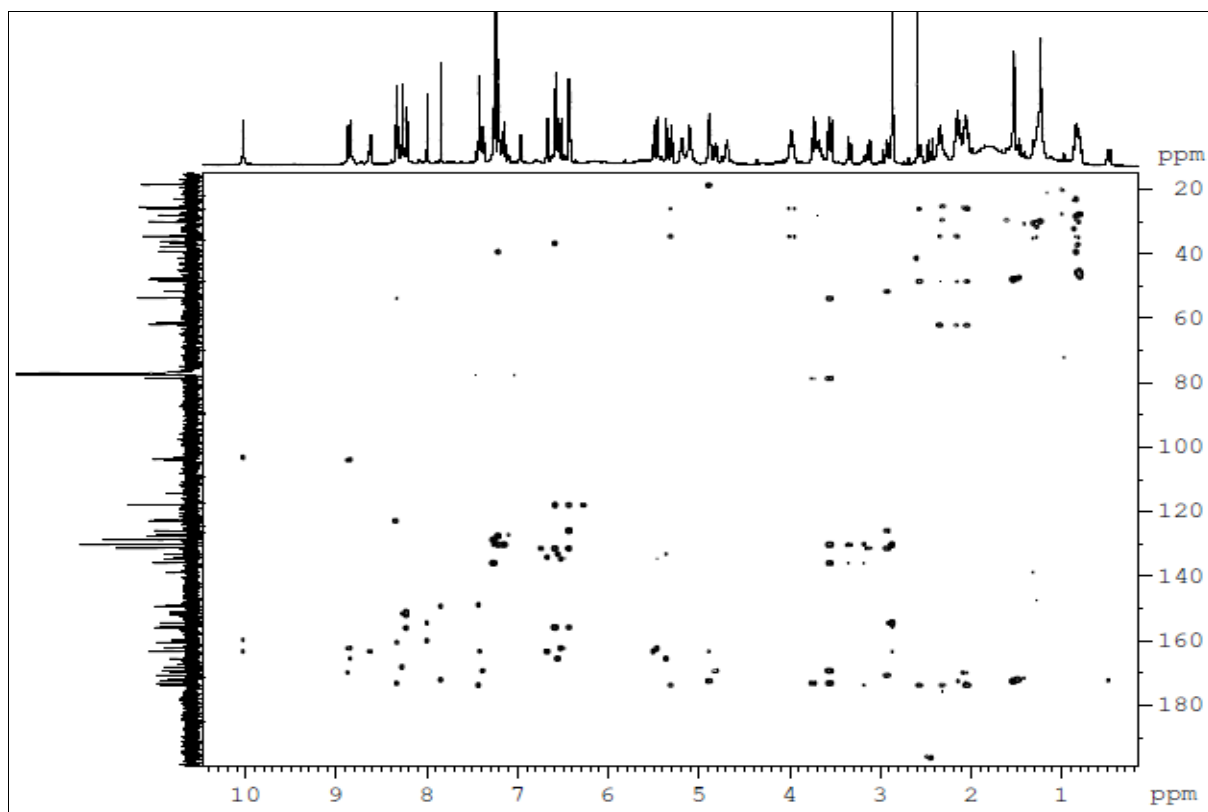
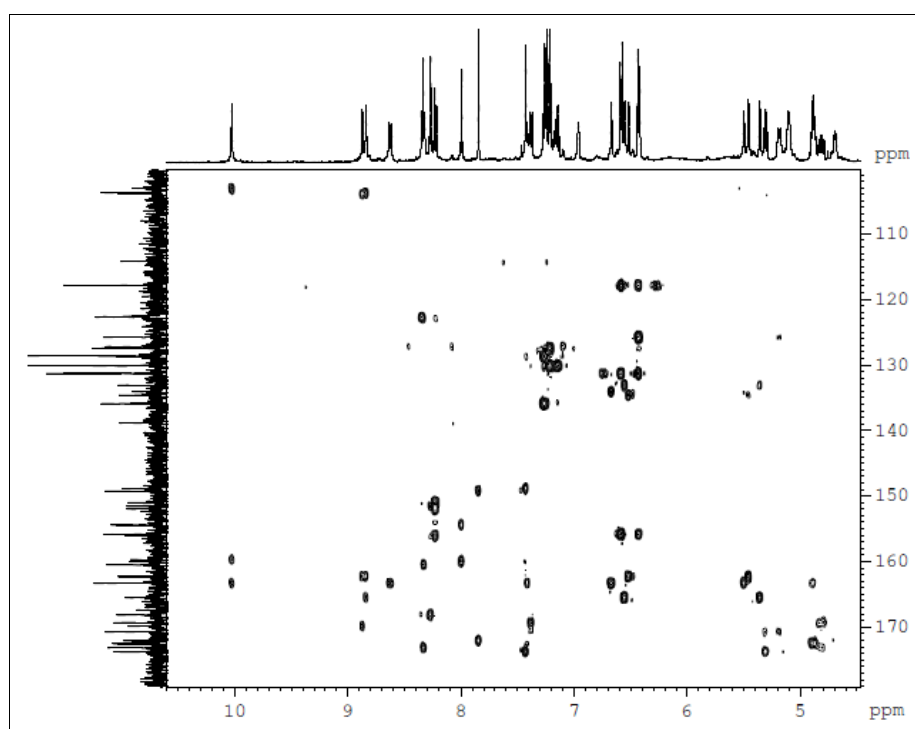
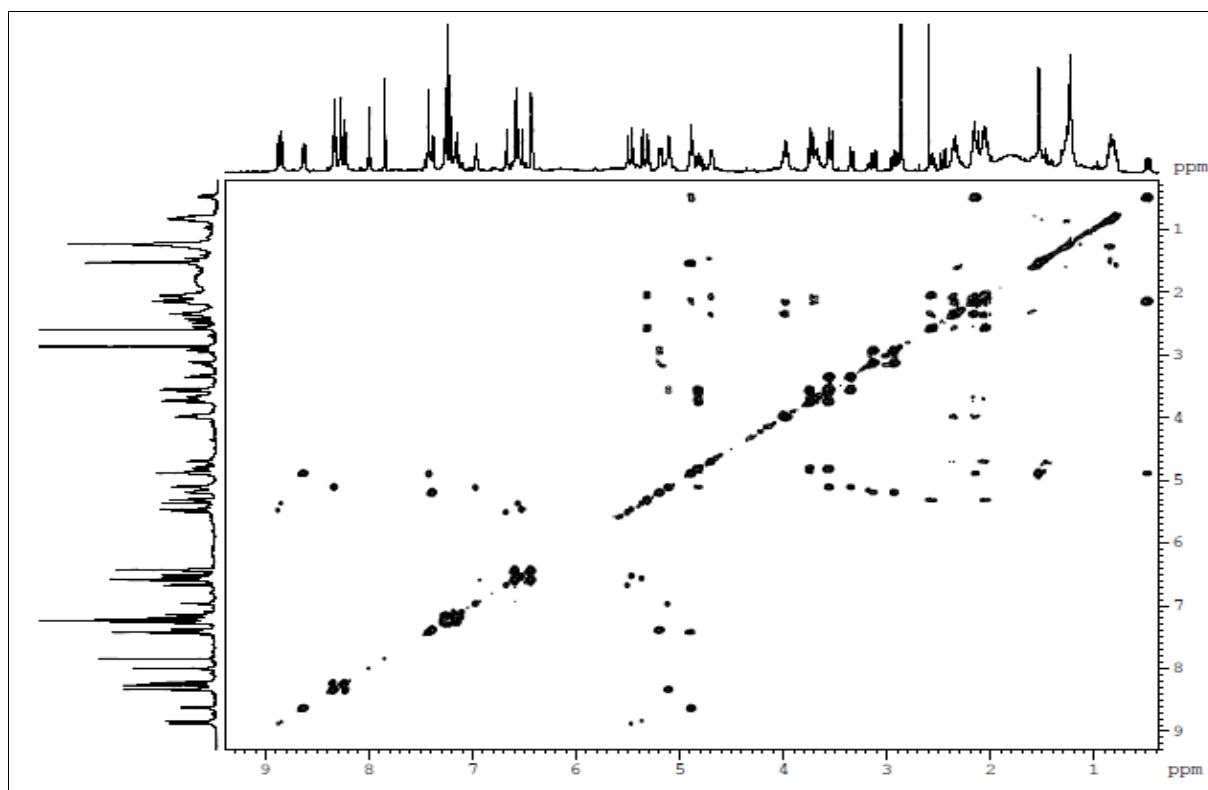
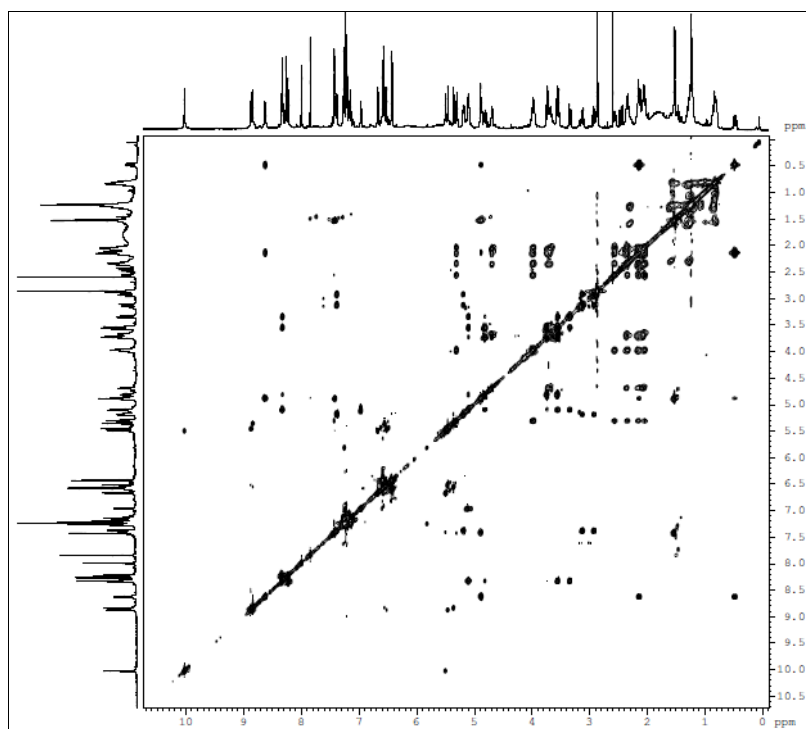
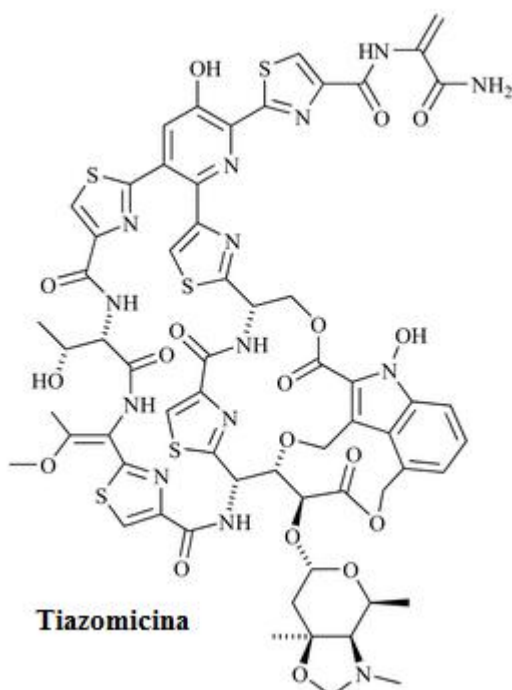
Figura 94: Espectro de RMN HMBC (125 MHz, CDCl_3) de K1**Figura 95:** Espectro de RMN HMBC (125 MHz, CDCl_3) de K1

Figura 96: Espectro de RMN COSY (500 MHz, CDCl_3) de K1**Figura 97:** Espectro de RMN TOCSY (500 MHz, CDCl_3) de K1

4.4.2 Atividade biológica

O composto Kocurina teve sua atividade antimicrobiana testada frente a um painel de bactérias e fungos patogênicos, incluindo cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) e cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a tiazomicina, um peptídeo tiazólico com propriedade antibiótica. Também foram testadas bactérias gram-positivas (*Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecium*), gram-negativas (*Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*) e o fungo *Candida albicans*.



Kocurina inibiu fortemente o crescimento de MRSA MB5393 com valores de concentração inibitória mínima (MIC) de 0,25µg/mL. Além disso, o composto exibiu também atividade antibacteriana contra as bactérias gram-positivas *B. subtilis* e *E. faecium*, em um teste de agar sólido, apresentando zonas de inibição de 9 e 10 mm, respectivamente, quando testados na concentração de 8 µg/mL.

kocurina apresentou zona de inibição de 5mm quando uma alíquota de 10µL, de uma solução com concentração 2 µg/mL, foi aplicada em placas contendo as culturas de células MRSA e cepas resistentes a tiazomicina.

kocurina não inibiu o crescimento de bactérias gram negativas e nem do fungo *C. albican* quando testado numa concentração de 16 µg/mL.

O aumento da resistência aos antibióticos conhecidos desenvolvidos por patógenos bacterianos é uma das maiores ameaças à saúde mundial humana. Embora sendo prevalente e as mais conhecidas, infecções por *Staphylococcus aureus* Resistentes à Meticilina (MRSA) são ainda a principal causa de morte, matando mais americanos todos os anos (~ 19000) do que enfisema, o HIV/AIDS, doença de Parkinson, e homicídio (KLEVENS *et al*, 2007). Portanto, existe ainda uma urgência de encontrar novos antibióticos anti-MRSA com novos modos de ação.

5. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

5.1 Métodos cromatográficos

5.1.1 Cromatografia de adsorção

Nas cromatografias de adsorção foi empregado gel de sílica 60 da Merk ou da Vetec [\varnothing μm 70-230 (cromatografia gravitacional) e \varnothing μm 230-400 (cromatografia *flash*)]. Na UFC, as colunas sob média pressão foram realizadas utilizando-se uma bomba de ar comprimido modelo Inalar Compact N° 682403 de Ind. de aparelhos médicos Ltda. Na Fundación Centro de Exelencia en Investigación de Medicamentos Innovadores en Andalucía (Fundación Medina), esse experimento foi realizado utilizando o sistema automático CombiFlash Rf, da marca Teledyne Isco. O comprimento e o diâmetro das colunas variaram de acordo com as alíquotas das amostras e as quantidades de gel de sílica utilizadas. Para cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) utilizou-se cromatoplasmas de gel de sílica 60 (\varnothing 5-40 μm) sobre alumínio da Merk. Os eluentes utilizados foram: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, puros ou combinados em proporções crescentes de polaridade.

A revelação das substâncias nas cromatoplasmas analíticas foi obtida por exposição à luz ultravioleta em dois comprimentos de onda (312 e 365 nm) emitidos por lâmpada modelo CN-15LM da Vilber Lourmat, bem como pela pulverização com solução de vanilina e ácido perclórico em etanol, seguido de aquecimento por aproximadamente 5 minutos.

5.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para análises por CLAE, realizadas na UFC, utilizou-se aparelho da marca SHIMADZU, modelo UFLC, equipado com detector UV-Vis com arranjo de diodo (SPD-M20A) e um sistema de bomba ternário. As separações foram efetuadas em coluna semi-preparativa Phenomenex® C18 (10 x 250 mm, 5 μm), mantidas num forno termostático a 40°C. Para as análises feitas na Fundación Medina, utilizou-se um cromatógrafo líquido da marca GILSON, modelo GX-281, equipado com detector UV-Vis com arranjo de diodos, acoplado a um injetor e coletor de frações, com sistema de bomba binário. As separações foram efetuadas em colunas Agilent Zorbax preparativa (21,2 x 250, mm, 7 μm) e semi-preparativa (9,4 x 250, mm, 5 μm), a temperatura ambiente. As amostras foram eluídas com água e metanol ou acetonitrila como ou sem TFA 0,1%.

Os solventes empregados apresentaram grau CLAE (MeOH ou ACN-Tedia e H₂O-Milli-Q) e foram adequadamente filtrados através de membranas de nylon com poros de 0,45

μm (Milipore). As amostras foram dissolvidas nas fases móveis empregadas em cada análise e filtradas através de membranas de nylon com poros de 0,45 μm (Whatman).

5.2 Métodos Físicos

5.2.1 Ponto de fusão

Os pontos de fusão dos compostos isolados foram obtidos em aparelho digital MQ APF-301, pertencente à central analítica do Departamento de Química Orgânica e inorgânica da Universidade Federal do Ceará. As determinações foram realizadas com uma velocidade de aquecimento 3°C/min e não foram corrigidos.

5.2.2 Rotação óptica

As rotações ópticas foram obtidas em polarímetro digital da Perkin-Elmer 341, pertencente à central analítica do Departamento de Química Orgânica e inorgânica da Universidade Federal do Ceará, à temperatura de 25°C.

5.3 Métodos Espectrométricos

5.3.1 Espectroscopia na região de absorção do infravermelho (IV)

Os espectros na região do infravermelho, obtidos numa faixa de 4000 a 400 cm^{-1} foram realizados em espectrômetro Perkin-Elmer, modelo SPECTRUM 100 FT-IR usando aparato UATR (universal attenuated total reflectance) ou em espectrômetro JASCO, modelo FT-IR-4100. O primeiro pertencente ao Departamento de Química Orgânica e inorgânica da Universidade Federal do Ceará e, o segundo, pertencente à Fundación Medina.

5.3.2 Espectrometria de massas (EM)

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos no Laboratório de Espectrometria de Massas do Nordeste, da Universidade Federal do Ceará (LEMANOR-UFC) e na Fundación Medina. No LEMANOR-UFC utilizou-se espectrômetro SHIMADZU, modelo LCMS-IT-TOF, equipado com uma fonte de ionização por electrospray (IES) ou ionização química atmosférica (APCI), sendo os *scans* adquiridos no modo positivo ou negativo. Condições gerais das análises: voltagens do capilar 3500 V; temperatura e fluxo do gás secante: 150 °C e 150 $\mu\text{L}/\text{h}$. Nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização e solução de NaTFA foi usada como padrão para calibração do IT-TOF. As moléculas protonadas

($[M+H]^+$) foram selecionadas e submetidas à fragmentação por CID (collision induced dissociation) usando argônio como gás de colisão. Os espectros EM/EM foram obtidos variando de 50 até 250% a energia de colisão relativa. As amostras (5 μ L) dissolvidas em solventes grau CLAE numa concentração de 1 μ g/mL foram introduzidas por injeção direta na fonte de ionização. Os valores de massas observados, bem como os cálculos de erros foram obtidos através do software *Formula Predictor*. Na Fundación Medina as análises de foram realizadas espectrômetro de massas Bruker maXis QTOF acoplado em CLAE Agilent 1100, usando coluna Zorbax (2,1 x 30 mm, 5 μ m), operado no modo ESI positivo. Condições gerais das análises: voltagens do capilar 4000 V; temperatura e o gás secante: 200°C e 11L/min e pressão do nebulizador de 2.8 bar. Nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização e solução de NaTFA foi usada como padrão para calibração. Os espectros de massas foram coletados com análises completas de 150 m/z até 1500 m/z .

5.3.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de 1H) e carbono ^{13}C (RMN de ^{13}C), uni e bidimensionais foram obtidos em espectrômetro Bruker, modelo DRX-500, no Centro Nordeste de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal do Ceará (CENAUREM-UFC) e em espectrômetro Bruker 500 MHz Advance III, equipado com criosonda de 1,7 mm, na Fundación Medina, ambos operando na frequência de 500 MHz para hidrogênio e 125 MHz para carbono-13.

Os solventes deuterados utilizados na dissolução das amostras e obtenção dos espectros foram: clorofórmio, metanol ou piridina.

Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em parte por milhão (ppm) e referenciados nos espectros de RMN 1H pelo pico de hidrogênio pertencente à fração não deuterada dos solventes: clorofórmio (δ_H 7,27), metanol (δ_H 3,31) e piridina (δ_H 8,74; 7,85 e 7,22) e para os espectros de RMN ^{13}C pelos picos de carbono-13 dos solventes: clorofórmio (δ_H 77,23), metanol (δ_H 49,15) e piridina (δ_H 123,87; 135,91 e 150,35).

As multiplicidades das absorções foram indicadas segundo a convenção: s (simpleto), sl (simpleto largo), d (duplete), dl (duplete largo), dt (duplo triplete), t (triplete), q (quarteto) e m (multiplete).

O padrão de hidrogenação dos carbonos foi determinado através da utilização da técnica DEPT 135° ou HSQC-editado e expressado segundo a convenção: C (carbono não hidrogenado), CH (carbono metínico), CH₂ (Carbono metilênico) e CH₃ (carbono metílico).

5.4 Estudos dos micro-organismos

Este trabalho relata o estudo de quatro bactérias marinhas. A bactéria *Pseudoalteromonas* sp. foi isolada a partir de um sedimento marinho coletado na praia da Taíba (São Gonçalo do Amarante, Ceará, Brasil). Nessa mesma praia, foi coletada a ascídia *Eudistoma vannahamei* (Fig. 98), um tunicado endêmico da costa nordeste do Brasil, de onde foram isolados os actinomicetos *Micromonospora* sp. e *Streptomyces* sp. A actinobactéria *Kocuria* sp. foi isolada a partir de uma esponja marinha coletada no arquipélago de Flórida Keys (EUA) e encontra-se depositada no banco de microrganismos pertencente a FUNDACIÓN MEDINA, situada em Granada, Espanha.

Figura 98: *Eudistoma vannahamei*



5.4.1 *Pseudoalteromonas* sp.

A amostra de sedimento foi coletada na praia da Taíba (03830'21.23 'S; 038853'40 0,16' W), que está localizada na costa nordeste do Brasil. A coleta foi realizada utilizando técnicas assépticas, onde o material foi recolhido e armazenado usando utensílios estéreis.

Para o isolamento dos microrganismos presentes no sedimento, as amostras foram suspensas em água do mar esterilizada numa proporção de 1: 5 (m /v). As amostras foram diluídas em série de 10⁻¹ para 10⁻⁵. Alíquotas de 0,1 ml de cada diluição foram plaqueadas em placas de Petri contendo meio de cultura agar de amido de caseína ou agar marinho. A

purificação de cada cepa foi garantida por coloração de Gram e microscopia de luz. As linhagens puras foram inoculadas em meio líquido para o crescimento em pequena escala.

Inicialmente, as culturas puras foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 ml de meio líquido. Os tubos foram mantidos sob uma temperatura constante e agitação durante 96 horas. Em seguida, as culturas crescidas foram diluídas em frascos de Erlenmeyer contendo 250 ml de meio de cultura e agitados a 200 rpm (28°C) por 7 dias.

A cultura resultante foi filtrada para separar a biomassa bacteriana do meio de cultura. A biomassa separada foi extraída com MeOH, enquanto que o meio foi extraído por partição líquido-líquido com AcOEt. Os extratos foram evaporados sob vácuo, lavados com MeOH para remover o sal em excesso, e totalmente secos sob ar comprimido para a obtenção dos extratos brutos. Neste ponto, os extratos foram preparados para serem avaliados quanto a sua atividade biológica.

A bactéria ativa identificada como *Pseudoalteromonas* sp. (Fig. 99) foi selecionada para crescimento em grande escala. Foram preparados 5 litros de meio de cultura, que foram inoculados e após crescimento foi extraído com 5 litros de AcOEt. Esse solvente foi concentrado a vácuo, seco com Na₂SO₄ rendendo 1,42 g do extrato bruto de cor vermelha.

Figura 99: Placa da bactéria *Pseudoalteromonas* sp.

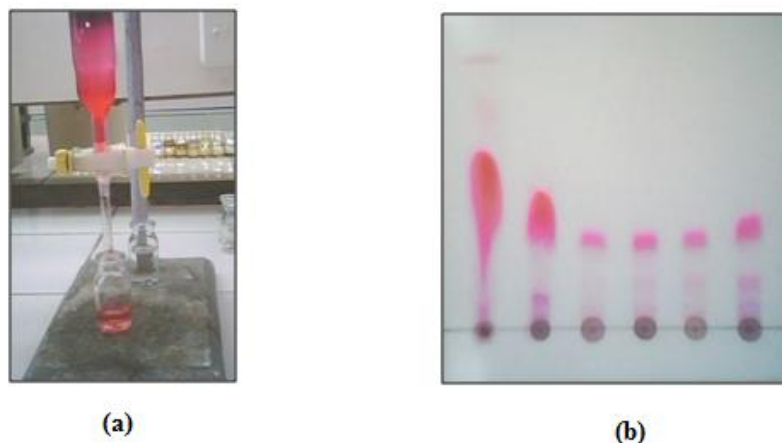


O extrato bruto foi fracionado por cromatografia em gel de sílica utilizando os solventes hexano, hexano / AcOEt 4: 1, 3: 2, 2: 3 e 1: 4, AcOEt, AcOEt / MeOH 4: 1, 1: 1, e MeOH, resultando em 74 frações de 8 mL cada. Essas frações foram analisadas por cromatografia de camada delgada e posteriormente agrupadas em 8 frações principais (F1-F8). O potencial citotóxico de cada fração foi avaliado, no entanto, somente a fração F3 (obtida por eluição com hexano / AcOEt 3: 2) foi ativa.

Uma alíquota da fração F3 (83,7 mg) foi aplicada numa placa preparativa de gel de sílica de alta performance (HPTLC, Merck) e eluída com a mistura de solventes

hexano/ CH_2Cl_2 /MeOH 5: 4,5: 0,5. O pigmento vermelho (33 mg) obtido foi submetido a cromatografia uma segunda vez utilizando o mesmo procedimento para se obter 16,4 mg de um composto puro nomeado como P-1. A Figura 100 abaixo mostra o fracionamento do extrato bruto em gel de sílica (a) e a cromatoplaça de isolamento do metabólito P-1(b).

Figura 100: Fracionamento do extrato bruto de *Pseudoalteromonas* sp (a) e cromatoplaça de isolamento do metabólito P-1 (b)



Uma alíquota da fração F1 (5 mg), obtida por eluição com hexano e hexano/ AcOEt 4: 1, foi submetida a uma reação de metanólise catalisada por ácido com MeOH/HCl (5%). Essa fração foi analisada por CG/MS por onde foi possível identificar sete ácidos graxos na forma de seus ésteres metílicos.

A fração F6 (198 mg), obtida por eluição com AcOEt, foi submetida a cromatografia gravitacional, sendo absorvida em gel de sílica, pulverizada em grau de porcelana e disposta sobre 13,4 g de gel de sílica em coluna de 3,5 cm de diâmetro interno. A eluição foi realizada com os solventes diclorometano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias, em gradiente crescente de polaridade. A fração eluída com CH_2Cl_2 /AcOEt 1:1 (18,1 mg) foi recromatografada em coluna flash utilizando a mistura dos solventes CH_2Cl_2 /MeOH 5% como eluente. Esse procedimento possibilitou o isolamento de 14,8 mg de um sólido branco nomeado como P-2.

A fração F7 (128 mg), obtida por eluição com AcOEt/MeOH 4: 1, foi submetida a cromatografia em coluna utilizando sephadex LH-20, eluída com metanol resultando em três sub-frações. A fração reunida Fr(23-38) foi recromatografada também por exclusão molecular possibilitando o isolamento de 13,6 mg de um sólido branco nomeado como P-3.

5.4.2 *Micromonospora* sp.

Micromonospora sp. (Fig. 101), bactéria associada a ascídia *Eudistoma vannamei* (Fig. 98, p. 144), foi isolada utilizando o meio de cultura GYM (extrato de malte, glicose e extrato de levedura). Este microrganismo foi identificado com base no sequenciamento do gene 16S rRNA e análise BLAST. A sequência de nucleotídeos foi submetida à NCBI GenBank e está disponível sob o número de acesso JN797618.

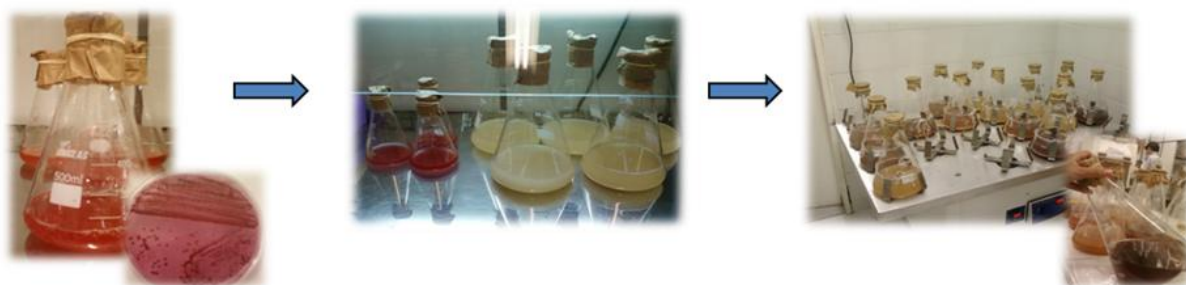
Figura 101: Placa de cultivo de *Micromonospora* sp.



Para obtenção do extrato, *Micromonospora* sp. foi cultivada em 18 L de caldo de cultivo A1, composto por peptona, extrato de amido e levedura, sob 200 rpm de agitação durante 10 dias à temperatura ambiente.

A Figura 102 abaixo mostra o processo de obtenção em grande escala.

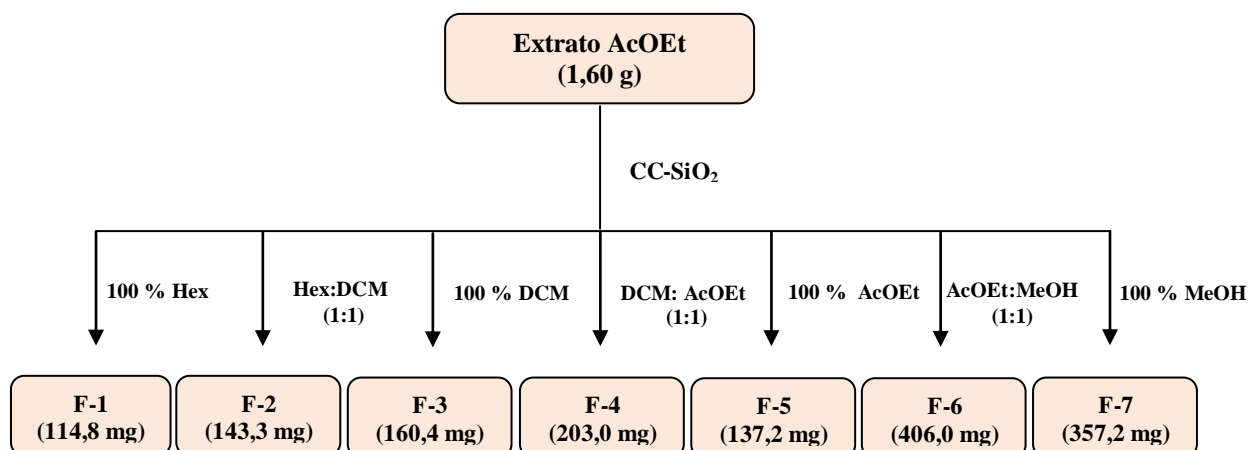
Figura 102: Obtenção dos fermentados de *Micromonospora* sp.



Ao fermentado obtido (18L) foi adicionado AcOEt e posteriormente foi submetido à agitação por 30 minutos a 200 rpm. A fase orgânica foi separada da fase aquosa, seca com Na_2SO_4 e concentrada sobre pressão reduzida para produzir 1,6 g de extrato bruto.

Esse material foi fracionado em gel de sílica obtendo-se 7 frações, exibidas no Fluxograma 1 abaixo.

Fluxograma 1: Fracionamento cromatográfico de *Micromonospora* sp



A fração F-2 foi submetida à cromatografia em coluna, sendo adsorvida em 131 mg de gel de sílica, pulverizada em grau de porcelana e disposta sobre 7,04 g de gel de sílica em coluna de 1,5 cm de diâmetro interno. A eluição foi realizada com os solventes hexano, CH_2Cl_2 e MeOH, puros ou em misturas binárias, em gradiente crescente de polaridade, nas proporções indicadas na Tabela 17. As frações resultantes foram comparadas por cromatografia em camada delgada e reunidas adequadamente. A fração F17-20 forneceu 4,0 mg de uma substância de coloração vermelha, que foi codificada como M-1 e submetida à RMN de ^1H e ^{13}C .

Tabela 17: Dados resultantes do fracionamento cromatográfico da fração F-2

Eluentes	Frações
Hexano	1-11
hexano/ CH_2Cl_2 (8:2)	12-16
hexano/ CH_2Cl_2 (7:3)	17-20
hexano/ CH_2Cl_2 (1:1)	21-25
CH_2Cl_2	26-30
Metanol	31-43

A fração F26-30 (48,6 mg) foi purificada por CLAE, injetando-se alíquotas de 200 µL da amostra dissolvida em MeOH numa concentração de aproximadamente 10mg/mL. A separação, utilizando uma coluna semi-preparativa de fase reversa C18, foi efetuada em condições isocráticas: MeOH/H₂O 95:5 (v/v), com um fluxo de 4,7 mL/min durante 15 minutos. O pico com tempo de retenção em 9 min foi coletado e, após seco, obteve-se 5,9 mg de um composto alaranjado denominado M-2.

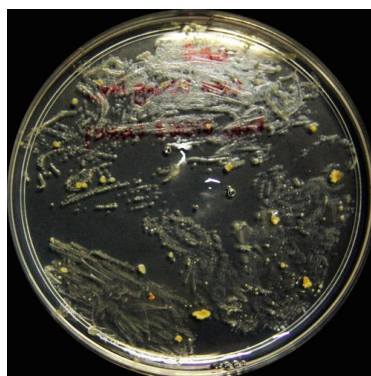
O composto M-3 foi isolado a partir da fração F-3 (160,4 mg) por CLAE, utilizando uma coluna semi-preparativa de fase normal - sílica e uma fase móvel composta por hex/isopropanol 10% num fluxo de 4,7 mL/min, durante 10 minutos. O cromatograma exibiu um pico majoritário com tempo de retenção em 5,5 min minutos que resultou em 6,5 mg de uma resina amarela.

A fração F-4 (203 mg) foi submetida à cromatografia em coluna *flash* usando um sistema isocrático de hexano/AcOEt 9:1 para fornecer 23 frações de aproximadamente 3 mL cada. O composto M-4 (2,1 mg) foi isolado a partir da reunião das frações F-16 a F-20 e apresentou-se como um sólido amarelo.

5.4.3 *Streptomyces sp.*

A bactéria marinha *Streptomyces sp.* (Fig 103), associada a ascídia *Eudistoma vannamei* (Fig. 98, p. 144), foi identificada com base no sequenciamento do rRNA 16S e análise BLAST. A sequência de nucleotídeos foi submetida à NCBI GenBank e está disponível sob o número de acesso JN797618.

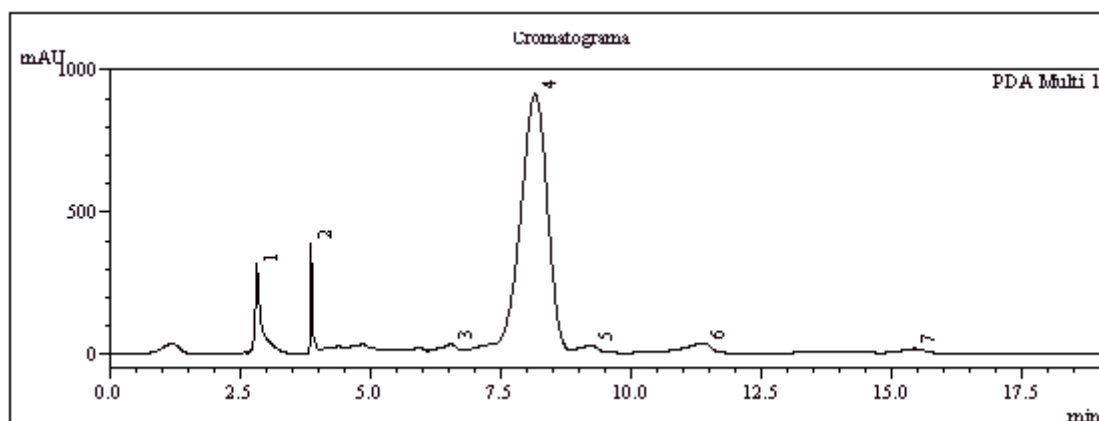
Figura 103: Placa de cultivo da bactéria *Streptomyces sp.*



Inicialmente foi feita uma curva de crescimento de *Streptomyces* sp. a fim de determinar o perfil de crescimento da bactéria. O experimento foi realizado em triplicata, com 100 mL de meio A1 (10 g amido + 4 g extrato de levedura + 2 g peptona, H₂O do mar para 1L) para cada erlenmeyer, totalizando 15 erlemeyers. As extrações foram feitas com acetato de etila em intervalos de dois dias (0, 2, 4, 6, 8, 10). A biomassa referente a cada dia de experimento foi centrifugada, lavada com 5 ml de água destilada, centrifugada durante 5 minutos a 5000 rpm, seca em estufa a 50 °C e pesada. Juntamente com o estudo de crescimento cinético, foi feita a avaliação da atividade citotóxica para cada dia de extração, a fim de analisar o perfil de atividade biológica em diferentes tempos de cultura. As extrações foram feitas com AcOEt. A partir deste experimento definiu-se o melhor dia para extração e isolamento dos princípios ativos do extrato.

Para a produção em grande escala, a cepa de *Streptomyces* sp. foi cultivada em 28 frascos de erlenmeyer, cada um contendo 500 mL do meio de cultura A1. Após 24 horas de crescimento a cada frasco de erlenmeyer foi adicionado 10 g da resina Amberlite® XAD 16 (Sigma) e a cultura foi submetida a agitação 200 rpm durante 8 dias, à temperatura ambiente. Posteriormente, o caldo de fermentação foi filtrado para separar o caldo de cultivo da resina. Essa a resina foi extraída com AcOEt e o material resultante foi seco sobre Na₂SO₄ e concentrado sobre pressão reduzida obtendo-se 371,9 mg de extrato bruto de coloração laranja.

O extrato obtido a partir da concentração dos 14 L de AcOEt foi inicialmente cromatografado em Sephadex LH-20, usando como eluente DCM:AcOEt 1:1, originando cinco frações (F-1 a F-5). A fração F-3 foi a mais ativa e, por isso, foi recromatografada em cartucho de sílica C-18 (SPE), obtendo-se 6 sub-frações, que tiveram sua atividade citotóxica avaliadas. A sub-fração 2, mais ativa, foi purificada por CLAE usando coluna semipreparativa C18 (250 mm x 10 mm x 5 um) no modo isocrático, usando como fase móvel ACN:H₂O (85:15; v/v) com fluxo de 4.5 mL min⁻¹. A Figura 104 (p. 151) mostra o cromatograma obtido para essa fração. O pico com tempo de retenção em 8,15 min foi coletado e resultou no isolamento de 49 mg de cristais de cor laranja que foram denominados como S-1.

Figura 104: Cromatograma de isolamento do metabólito S-1

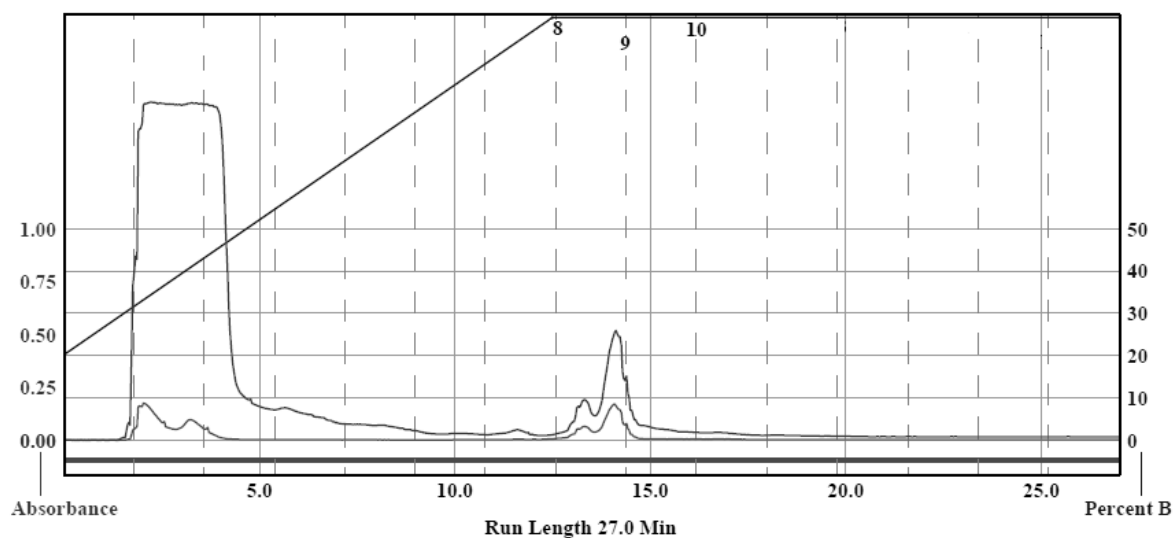
5.4.4 *Kocuria* sp

A actinobacteria *Kocuria* sp. foi isolada a partir de uma esponja marinha coletada no arquipélago de Flórida Keys (EUA) e encontra-se depositado no banco de micro-organismos pertencente a FUNDACIÓN MEDINA, situada em Granada, Espanha.

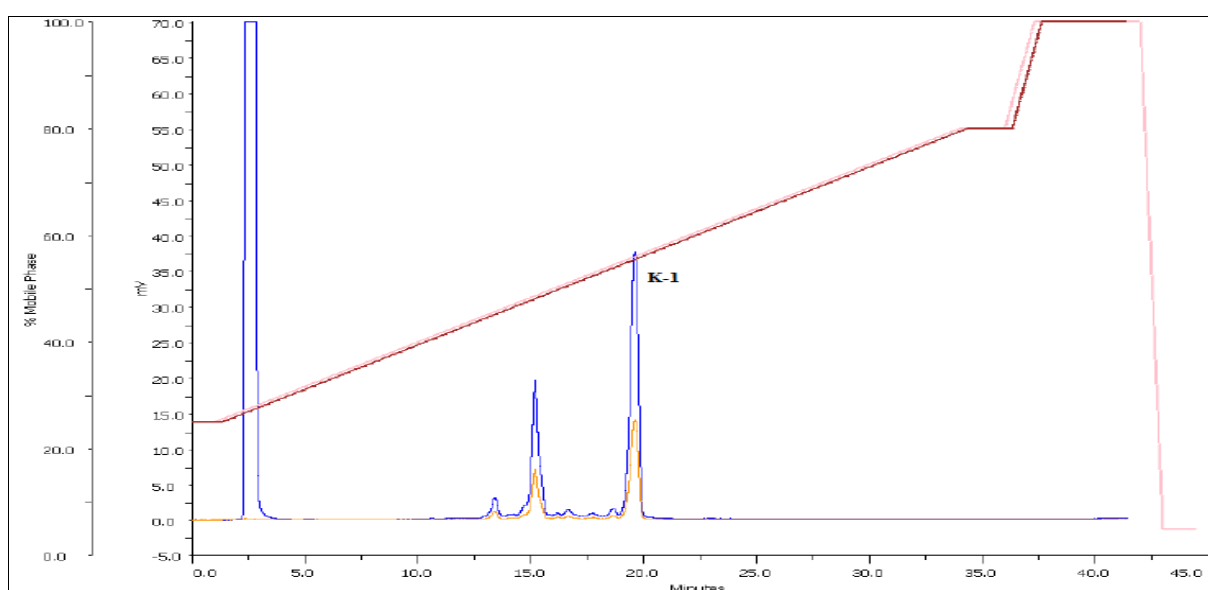
Para obtenção do extrato, *Kocuria* sp. foi fermentada em larga escala inoculando 48 erlenmeyers contendo 150 mL do meio de cultura R358 (10 g de amido de batata, 4g de extrato de levedura, 2g de peptona, 0,04g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g de KBr, em 1000 mL de H_2O destilada, pH 7) suplementado com 3% de sais marinhos Sigma Aldrich. Os erlenmeyers foram incubados com agitação a 220 rpm por 24 horas com temperatura controlada a 28°C.

O caldo de cultivo (7,2 L) de *Kocuria* sp. foi centrifugado a 8500 rpm por 15 minutos e, cuidadosamente, a biomassa foi separada do caldo sobrenadante. A biomassa obtida foi lavada com metanol por três vezes (3 x 50 mL) e novamente centrifugada. O sobrenadante foi separado e concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida, até a completa eliminação do solvente.

O extrato obtido foi retomado em DMSO e submetido a fracionamento em Combi Flash[®] utilizando cartucho RediSep C18 (com 15,5 g de adsorvente) previamente condicionado. A eluição foi realizada com os solventes metanol e água em um gradiente de 20 a 100% de metanol em 12,5 minutos seguindo num isocrático 100% de metanol até 27 minutos (Fig. 105). O fluxo usado foi de 10mL/min e coletou-se 16 frações de 18 mL. Utilizaram-se os comprimentos de onda 210 e 305 nm.

Figura 105: Perfil cromatográfico do extrato metanólico de *Kocuria* sp. em Combi Flash

A fração F-8, resultante do fracionamento por cartucho C18, foi solubilizada em DMSO e recromatografada por CLAE semi-preparativo Gilson utilizando coluna da marca Bridge Fenilo (10 x 150 mm x 5 μ m) e um gradiente ACN: H₂O de 25 a 80% de ACN em 35 minutos, com fluxo de 3.6 mL/min. A Figura 106 mostra o cromatograma dessa fração. O pico com o tempo de retenção 19,8 minutos, correspondentes às frações Fr38-42, foi coletado resultando em 1,4 mg de um sólido branco, codificado como K-1.

Figura 106: Perfil cromatográfico da Fração F8

5.4.4.1 Análise de Marfey's

Reação de Hidrólise

Para hidrólise de K-1 uma quantidade de 0,1 mg foi tratada com HCl 6 N (50 mM) a 110 °C por 24 horas em frasco fechado. Para derivatização de Marfey's o hidrolisado obtido foi seco e reconstituído em 50 µl de H₂O e, posteriormente foi adicionado 150 µL de uma solução de 1-fluoro-2,4-dinitrofenil-5-L-valina-amida (L-FDVA, 1% w/v em acetona) e 20 µL de uma solução de 1 M de NaHCO₃. Essa mistura foi mantida por 1 hora em banho maria a 40 ° C. Terminada a reação, foram adicionados à mistura reacional 20 µL de HCl 1 N. Uma alíquota de 10 µL da solução resultante foi diluída em 40 µL de CH₃CN e analisada por LC-MS utilizando coluna Waters x Bridg C18 (4,6 x 150 mm, 5 µm) e um perfil de eluição em gradiente de 10% de B (90% de CH₃CN, 10% de H₂O, 1,3 mM de TFA, 1,3 mM de formiato de amônio) / 90% A (10% de CH₃CN, 90% de H₂O, 1,3 mM de TFA, 1,3 mM de formiato de amônio) a 55% B / 45% de A durante 35 min com um fluxo de 1 mL/min. O mesmo procedimento de hidrólise e derivatização de Marfey's foi realizado para os aminoácidos padrões.

Reação de Ozonólise

Uma amostra de K-1 (0.2 mg) foi dissolvida em 2 mL de CH₃OH e foi borbulhada com ozônio durante 10 min. Esta solução foi evaporada até à secura num evaporador rotativo. Uma porção (0,1 mg) foi hidrolisada como descrito acima.

5.5 Atividades Biológicas

5.5.1 Ensaio de Atividade Citotóxica em células tumorais in vitro - MTT

O método do MTT consiste em uma análise colorimétrica indireta, baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H brometo de tetrazólio (MTT), de cor amarela, para o formazan, composto de cor azul-arroxeadada. Essa conversão do MTT em formazan ocorre apenas em células viáveis e metabolicamente ativas, através da ação da enzima succinil-desidrogenase presente nas mitocôndrias, desta forma a quantificação indireta da porcentagem de células vivas pode ser mensurada por espectrofotômetro (MOSMANN, 1983).

As células aderidas foram plaqueadas em placas de 96 poços em concentração de 5×10^4 células/mL. As células foram tratadas com a ditiolpirrolona durante 72 horas, em concentrações variando de 0,016 a 5 μ M, sob as mesmas condições de cultivo já descritas. Três horas antes do fim do tempo de incubação o sobrenadante foi descartado e, em seguida, em cada poço foi adicionado 150 μ L da solução de MTT 10% em meio RPMI 1640, e novamente incubada por 3 horas. Após esse período o sobrenadante foi descartado, permanecendo somente o precipitado azul de formazan. Esse precipitado foi então ressuspendido em 150 μ L de DMSO e agitado por cerca de 10 minutos até sua completa dissolução. As absorbâncias foram medidas no espectrofotômetro de placa, no comprimento de onda de 595 nm.

Os compostos foram testados em diluição seriada, em duplicata, e suas IC₅₀ (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%) foram determinados a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prism versão 4.0 (GraphPad Software).

5.5.2 Ensaio Antifúngico

No ensaio antifúngico foram utilizados estoques congelados de *C. albicans* para inocular placas contendo o meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar. As placas foram incubadas durante 24 h, a 35 °C. As colônias que cresceram foram colhidas a partir das placas e suspensas em meio RPMI-1640 modificado (Martín, *et al.*, 2012). Este inóculo foi diluído 1:10 e mantido em gelo até ser utilizado para inocular placas de microtitulação de 96 poços. Para o ensaio, 90 μ L do inóculo diluído foram misturados a 1,6 μ L de um solução do

composto a ser avaliado em DMSO e a 8,4 µL do meio RPMI-1640 modificado. Anfotericina B e penicilina G foram utilizados como controles internos positivos e negativos, respectivamente. As placas de ensaio foram lidas em espectrofotômetro Ultraevolution Tecan em 612 nm para T₀ (tempo zero). Em seguida, as placas foram incubadas estaticamente a 37 °C durante 20 h. Após a incubação, as placas foram agitadas em um DPC Micromix-5 e lidas novamente para T_F (tempo final). O composto avaliado foi diluído em série com DMSO com um fator de diluição de 2 para fornecer concentrações de 10 a partir de 160 µg/mL. A concentração inibitória mínima (MIC) foi definida como a menor concentração de um composto antimicrobiano ou antifúngico que inibiu ≥ 95% do crescimento de um microrganismo após a incubação durante a noite. Os dados foram analisados utilizando o programa Genedata Screener (Genedata AG, Suíça). Em todas as experiências realizadas neste trabalho o fator RZ obtidos situou-se entre 0,85 e 0,95.

5.5.3 Ensaio Antibacteriano

Para os ensaios antibacterianos os inóculos foram preparados a partir de suspensões congeladas dos micro-organismos MRSA, *A. baumannii*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Colônias isoladas de cada micro-organismo foram inoculadas em 10 mL de meio Luria-Bertani broth e incubados durante a noite a 37 °C com agitação a 220 rpm e, em seguida, diluiu-se a fim de obter inóculos de aproximadamente $1,1 \times 10^6$ CFU / mL (MRSA) ou $5-6 \times 10^5$ CFU / mL (*A. baumannii*, *E. coli* e *P. aeruginosa*). Para o ensaio 90 µL do inóculo foram misturados com 1,6 µL de cada um dos compostos dissolvidos em DMSO e 8,4 µL de meio LB. Canamicina e anfotericina B (MRSA), rifampicina e anfotericina B (*A. baumannii*), novobiocina e anfotericina B (*E. coli*), e a ciprofloxacina e anfotericina B (*P. aeruginosa*) foram incluídos como controles internos da placa. Absorbância a 612 nm foi medida com um espectrofotômetro UltraEvolution Tecan (Tecan, Durham, EUA) em T₀ (tempo zero) e imediatamente depois disso, as placas foram incubadas estaticamente a 37 °C durante 20 h. Após este período, as placas de ensaio foram agitadas usando o DPC Micromix-5 e mais uma vez se a absorbância a OD 612 nm foi medida a T_F (tempo final).

Ensaio em placas de agar sólido foram realizados a fim de determinar a susceptibilidade antimicrobiana do composto analisado contra *B. subtilis* MB964, *E. faecium* MB5571 resistentes à vancomicina e antibióticos β-lactâmicos e cepas de *S. aureus* resistentes a tiazomicina. As placas de ensaio contendo células de *B. subtilis* MB964 foram preparadas

por adição de 1 mL ($1,5 \times 10^8$ CFU / mL) de uma suspensão de esporos (Difco) a 1 litro de meio agar com extrato de levedura (Naye, nutriente agar 23 g /L de levedura, extrair 2 g/L). As cepas de *E. faecium* foram agitadas (220 rpm) e cultivadas em agar infusão de cérebro e coração (BHI, 37 g/L) a 37 ° C. As placas de ensaio foram preparadas inoculando os mesmos meios com 3,3% do inoculo ajustadas para uma densidade óptica (DO) da faixa de 0,22-0,35 a 660 nm. Os tipos selvagens de *S. aureus* Smith MB2865 e *S. aureus* resistente a tiazomicina MB5832 foram cultivadas em 10 ml de meio LB durante a noite. O crescimento durante a noite foi ajustado a uma densidade óptica de 0,2 a 600 nm. A suspensão foi então adicionada a placas de agar LB fundida na proporção de 25 mL /L. A atividade foi determinada medindo a diferença da zona de folgas observadas entre o tipo selvagem versus a chapa resistente. O composto testado foi diluído em série com DMSO de 20% com um fator de diluição de 2 para fornecer 10 concentrações do composto a partir de 128 µg/ml para todos os ensaios de agar. Dez microlitros de cada concentração de composto foram aplicados à placa de agar contendo o micro-organismo patogênico.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi relatado o estudo químico e biológico das bactérias marinhas *Pseudoalteromonas* sp., *Micromonospora* sp., *Streptomyces* sp. e *Kocuria* sp., que resultou no isolamento de 9 compostos, entre eles, quatro antraciclínicas e um peptídeo tiazólico os quais foram relatados pela primeira vez na literatura.

A bactéria *Pseudoalteromonas* sp. foi obtida a partir de um sedimento marinho coletado na praia da Taíba, litoral do estado de Ceará, e seu estudo químico resultou no isolamento da prodigiosina e de dois ácidos biliares identificados como ácido desoxicólico e ácido cólico. Também foram identificados sete ácidos graxos na forma de seus ésteres metílicos: ácido hexadecanóico; ácido *cis*-9-hexadecénoico, ácido *trans*-9-hexadecénoico, ácido heptadecanóico, ácido 9-heptadecénoico, ácido octadecanóico e ácido 9-octadecénoico. O estudo citotóxico da prodigiosina revelou IC₅₀ semelhantes ao padrão positivo doxorrubicina e melhores que o padrão quando testados frente às linhagens tumorais de melanoma (MDA-MB-435) e glioblastoma (SF-295). Os resultados obtidos foram publicados na revista *Chemistry & Biodiversity* intitulado como “Studies on the secondary metabolites of a *Pseudoalteromonas* sp. isolated from sediments collected at the northeastern coast of Brazil”, em 2012.

O estudo químico de *Micromonospora* sp., bactéria associada a ascídia *Eudistoma vancouveri*, possibilitou o isolamento de quatro antraciclínicas: 4,6,11-trihidroxi-9-propiltetraceno-5,12-diona; 4-metoxi-9-propiltetraceno-6,11-diona; 7,8,9,10-tetrahidro-9-hidroxi-4-metoxi-9-propiltetra-ceno-6,11-diona e 10 β -metoxicarbonil-7,8,9,10-tetrahidro-4,6,7 α ,9 α ,11-pentahidroxi-9-propil-tetraceno-5,12-diona. Estes compostos tiveram suas atividades citotóxicas avaliadas frente a células de adenocarcinoma humano (HCT-8), mostrando-se moderadamente ou fracamente ativos. Os resultados desse estudo resultaram na publicação de dois artigos, um no *Journal of Natural Products*, intitulado como Anthracyclines from *Micromonospora* sp. (2012) e o outro na *Latin American Journal of Aquatic Research*, intitulado como Cytotoxicity of actinomycetes associated with the ascidian *Eudistoma vancouveri* (Millar, 1977), endemic of northeastern coast of Brazil (2013).

Um exemplar de *Streptomyces* sp. também foi isolado da ascídia *Eudistoma vancouveri* e seu estudo químico resultou no isolamento de uma ditiopirrolidina identificada como 5-oxo-6-(*N*-metilformamida)-4,5-diidro-1,2-ditiol[4,3-*b*]pirrol. No ensaio de citotoxicidade esse metabólito mostrou-se bastante ativo frente a todas as linhagens testadas mostrando IC₅₀

inferiores a 6,0 μM , contudo os melhores resultados foram observados para as linhagens de próstata metastática (PC-3M), carcinoma de ovário (OVCAR-8) e glioblastoma (SF-295) com IC_{50} de 1,66; 1,05 e 1,52 μM , respectivamente. Estes e outros resultados referentes ao mecanismo de ação dessas substâncias estão sendo escritos para posterior publicação.

O extrato metanólico da bactéria marinha *Kocuria* sp., associada a uma esponja marinha coletada no arquipélago de Florida Keys, possibilitou a descoberta do novo peptídeo nomeado como Kocurina. Esse metabólito teve sua configuração absoluta determinada pela aplicação da metodologia de Marfey e teve sua atividade biológica testada frente a um painel de bactérias e fungos patogênicos. Kocurina inibiu fortemente o crescimento de MRSA MB5393 com valores de MIC de 0,25 $\mu\text{g/mL}$, além de apresentar atividade antibacteriana contra as bactérias *B. subtilis* e *E. faecium*, com zonas de inibição de 9 e 10 mm, respectivamente. Os resultados desse estudo foram publicados na revista *Marine Drugs*, intitulado como “Kocurin, the True Structure of PM181104, an Anti-Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Thiazolyl Peptide from the Marine-Derived Bacterium *Kocuria palustris*” (2013).

Apoiando-se nos diversos estudos precedentes, e nos resultados gerados através do desenvolvimento do presente trabalho fica bastante claro que os micro-organismos são uma fonte emergente e promissora para a descoberta de metabólitos secundários bioativos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAYOMI, E. A.; SISSOLAK, G.; JACOBS, P. Use of novel proteasome inhibitors as a therapeutic strategy in lymphomas current experience and emerging concepts. **Transfus. Apher. Sci.**, v. 37, p. 85-92, 2007.

ABDALLA, M. A.; HELMKE, E.; LAATSCH, H. Fujianmycin C, a bioactive angucyclinone from a marine derived *Streptomyces* sp. B6219. **Nat. Prod. Commun.**, v. 5. p. 1917-1920, 2010.

ABDEL-MAGEED, W. M.; MILNE, B. F.; WAGNER, V.; SCHUMACHER, M.; SANDOR, P.; PATHOM-AREE, W.; GOODFELLOW, M.; BULL, A. T.; HORIKOSHI, K.; EBEL, R.; DIEDERICH, M.; FIEDLER, H.-P.; JASPARS, M. Dermacozines, a new phenazine family from deep-sea dermacocci isolated from a Mariana Trench sediment. **Org. Biomol. Chem.**, v. 8, p. 2352-2362, 2010.

ABDELMOHSENA, U. R.; ZHANG, G.; PHILIPPE, A.; SCHMITZ, W.; PIMENTEL-ELARDO, S. M.; HERTLEIN-AMSLINGER, B.; HENTSCHEL, U.; BRINGMANN, G. Cyclodisidins A-D, cyclic lipopeptides from the marine sponge-derived *Streptomyces* strain RV15. **Tetrahedron Lett.**, v.53, p. 23-29, 2012.

ABREU, P. A. Mecanismos envolvidos na citotoxicidade de uma ditiolpirrolona obtida de *Streptomyces* sp. 2013.89 f. **Dissertação** (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

ALIHOSSEINI, F.; JU, K.S.; LANGO, J.; HAMMOCK, B. D.; SUN, G. Antibacterial colorants: characterization of prodiginines and their applications on textile materials. **Biotechnol. Progr.**, v. 24, p.742-747, 2008.

AL-ZEREINI, W.; SCHUHMANN, I.; LAATSCH, H.; HELMKE, E.; ANKE, H. New aromatic nitro compounds from *Salegentibacter* sp. T436, an Arctic Sea ice bacterium: taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. **J. Antibiot.**, v. 60, p. 301-308, 2007.

AL-ZEREINI, W.; YAO, C. B. F. F.; LAATSCH, H.; ANKE, H. Aqabamycins A-G: Novel nitro maleimides from a marine *Vibrio* species. I.Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. **J. Antibiot.**,v. 63, p. 297-301, 2010.

AMAGATA, T.; XIAO, J.; CHEN, Y-P.; HOLSOPPLE, N.; OLIVER, A. G.; GOKEY, T.; GULIAEV, A. B.; MINOURA, K. Creation of an HDAC-based yeast screening method for evaluation of marine-derived actinomycetes: discovery of streptosetin A. **J. Nat. Prod.**, v. 75, p. 2193-2199, 2012.

ANDRIANASOLO, E. H.; HARAMATY, L.; ROSARIO-PASSAPERA, R.; BIDDLE, K.; WHITE, E.; VETRIANI, C.; FALKOWSKI, P.; LUTZ, R. Ammonificins C and D, hydroxyethylamine chromene derivatives from a cultured marine hydrothermal vent bacterium, *Thermovibrio ammonificans*. **J. Nat. Prod.**, v. 72, p. 1216-1219, 2009.

- ANDRIANASOLO, E. H.; HARAMATY, L.; ROSARIO-PASSAPERA, R.; VETRIANI, C.; FALKOWSKI, P.; WHITE, E.; LUTZ, R. Ammonificins C and D, hydroxyethylamine chromene derivatives from a cultured marine hydrothermal vent bacterium, *Thermovibrio ammonificans*. **Mar. Drugs**, v. 10, p. 2300-2311, 2012.
- ASOLKAR, R. N.; KIRKLAND, T.N.; JENSEN, P.R.; FENICAL, W. Arenimycin, an antibiotic effective against rifampin- and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from the marine actinomycete *Salinispora arenicola*. **J. Antibiot.**, v. 63, p. 37-39, 2010.
- ASOLKAR, R. N.; FREEL, K. C.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W.; KONDRATYUK, T. P.; PARK, E. J.; PEZZUTO, J. M. Arenamides A-C, cytotoxic NFkappaB inhibitors from the marine actinomycete *Salinispora arenicola*. **J. Nat. Prod.**, v. 72, p. 396-402, 2009.
- ASOLKAR, R. N.; SCHRÖDER, D.; HECKMANN, R.; LANG, S.; WAGNER-DÖBLER, I.; LAATSCH, H. Helquinoline, a new tetrahydroquinoline antibiotic from *Janibacter limosus* Hel 1. **J. Antibiot.**, v. 57, p.17-23, 2004.
- ASOLKAR, R.N.; JENSEN, P. R.; KAUFFMAN, C. A.; FENICAL, W. Daryamides A-C, weakly cytotoxic polyketides from a marine-derived actinomycete of the genus *Streptomyces* strain CNQ-085. **J. Nat. Prod.**, v. 69, p.1756-1759, 2006.
- AZUMI, M.; OGAWA, K.; FUJITA, T.; TAKESHITA, M.; YOSHIDA, R.; FURUMAI, T.; IGARASHI, Y. Bioactive microbial metabolites. Part 33. Bacilosarcins A and B, novel bioactive isocoumarins with unusual heterocyclic cores from the marine-derived bacterium *Bacillus subtilis*. **Tetrahedron**, v. 64, p. 6420-6425, 2008.
- BARBEAU, K.; ZHANG, G.; LIVE, D.H.; BUTLER, A. Petrobactin, a photoreactive siderophore produced by the oil-degrading marine bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. **J. Am. Chem. Soc.**, v.124, p. 378-379, 2002.
- BENNETT, J. W.; BENTLEY, R. Seeing red: The story of prodigiosin. **Adv. Appl. Microbiol.**, v. 47, p.1-32, 2000.
- BERGERON, R. J.; HUANG, G.; SMITH, R. E.; BHARTI, N.; MCMANIS, J. S.; BUTLER, A. Total synthesis and structure revision of petrobactin. **Tetrahedron**, v. 59, p.2007-2014, 2003.
- BERRUE, F.; IBRAHIM, A.; BOLAND, P.; KERR, R. G. Newly isolated marine *Bacillus pumilus* (SP21): A source of novel lipoamides and other antimicrobial agents. **Pure Appl. Chem.**, v. 81, p. 1027-1031, 2009.
- BHUSHAN, R.; BRUCKNER, H. Marfey's reagent for chiral amino acid analysis: a review. **Amino Acids**, v. 27, p. 231-247, 2004.
- BISTER, B.; BISCHOFF, D.; STRÖBELE, M.; RIEDLINGER, J.; REICKE, A.; WOLTER, F.; BULL, A. T.; ZÄHNER, H.; FIEDLER, H-P.; SUSSMUTH, R. D. Abyssomicin C- a polycyclic antibiotic from a marine *Verrucosispora* strain as an inhibitor of the p-aminobenzoic acid/tetrahydrofolate biosynthesis pathway. **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 43, p. 2574-2576, 2004.
-

BITZER, J.; GROSSE, T.; WANG, L.; LANG, S.; BEIL, W.; ZEECK, A. New aminophenoxazinones from a marine *Halomonas* sp.: fermentation, structure elucidation, and biological activity. **J. Antibiot.**, v. 59, p. 86-92, 2006.

BLASIAK, L. C.; CLARDY, J. Discovery of 3-formyl-tyrosine metabolites from *Pseudoalteromonas tunicata* through heterologous expression. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 132, p. 926-927, 2010.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; HU, W. P.; MUNRO, M. H.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Nat. Prod. Rep.**, v. 24, p. 31-86, 2007.

BOONLARPPRADAB, C.; KAUFFMAN, C. A.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Marineosins A and B, cytotoxic piroaminals from a marine-derived actinomycete. **Org. Lett.**, v.10, p. 5505-5508, 2008.

BOWMAN, J. P. Bioactive compound synthetic capacity and ecological significance of marine bacterial genus *Pseudoalteromonas*. **Mar. Drugs**, v. 5, p.220-241, 2007.

BUCHANAN, G.O.; WILLIAMS, P. G.; FELING, R. H.; KAUFFMAN, C. A.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Sporolides A and B: structurally unprecedented halogenated macrolides from the marine actinomycete *Salinispora tropica*. **Org. Lett.**, v. 7, p. 2731-2734, 2005.

BUGNI, T. S.; WOOLERY, M.; KAUFFMAN, C. A.; JENSEN, P.R.; FENICAL, W. Bohemamines from a marine-derived *Streptomyces* sp. **J. Nat. Prod.**, v. 69, p. 1626-1628, 2006.

BULL, A. T.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift, microbiology and molecular biology. **Reviews**, v. 3, p. 573-606, 2000.

BUTLER, M.S. & BUSS, A. D. Natural products - The future scaffolds for novel antibiotics? **Biochem. Pharmacol.**, v. 71, p. 919- 929, 2006.

CAI, S.-X.; LI, D.-H.; ZHU, T.-J.; WANG, F.-P.; XIAO, X.; GU, Q.-Q. Two new indole alkaloids from the marine-derived bacterium *Aeromonas* sp. CB101. **Helv. Chim. Acta**, v. 93, p. 791-795, 2010.

CARLSON, J. C.; LI, S.; BURR, D. A.; SHERMAN, D. H. Isolation and characterization of tirandamycins from a marine-derived *Streptomyces* sp. **J. Nat. Prod.**, v. 72, p. 2076 -2079, 2009.

CHA, J. W.; PARK, J-S.; SIM, T.; NAM, S-J.; KWON, H. C.; DELVALLE, J. R.; FENICAL, W. Structure assignment of lucentamycin e and revision of the olefin geometries of the marine-derived lucentamycins. **J. Nat. Prod.**, v.75, p.1648-1651, 2012.

CHARAN, R.D.; SCHLINGMANN, G.; JANSO, J.; BERNAN, V.; FENG, X.; CARTER, G.T. Diazepinomicin, a new antimicrobial alkaloid from marine *Micromonospora* sp. **J. Nat. Prod.**, v.67, p.1431-1433, 2004.

CHAU, R.; KALAITZIS, J. A.; NEILAN, B. A. On the origins and biosynthesis of tetrodotoxin. **Aquat. Toxicol.**, v. 104, p. 61-72, 2011.

CHEN, G.; GAO, H.; TANG, J.; HUANG, Y.; CHEN, Y.; WANG, Y.; ZHAO, H.; LIN, H.; XIE, Q.; HONG, K.; LI, J.; YAO, X. Benzamides and quinazolines from a mangrove actinomycetes *Streptomyces* sp. (No. 061316) and their inhibiting caspase-3 catalytic activity *in vitro*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 59, p. 447-451, 2011.

CHEN, G.-Y.; ZHU, F.; LIN, Y. -C. A novel 8-membered macrolide produced by a marine - derived actinomycete *Streptomyces* sp. V5. **Youji Huaxue**, v. 27, p. 1159-1161, 2007.

CHEN, Y. H.; LU, M. C.; CHANG, Y. C.; HWANG, T. L.; WANG, W. H.; WENG, C. F.; KUO, J.; SUNG, P. J. Pseudoalteromone A: a novel bioactive ubiquinone from a marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. CGH2XX (Pseudoalteromonadaceae). **Tetrahedron Lett.**, v. 53, p. 1675-1677, 2012.

CHEN, Y-H.; KUO, J.; SU, J-H.; HWANG, T-L.; CHEN, Y-H.; LEE, C-H.; WENG, C-F.; SUNG, P-J. Pseudoalteromone B: A novel 15C compound from a marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. CGH2XX. **Mar. Drugs**, v. 10, p. 1566-1571, 2012.

CHENG, C.; PAN, L.; CHEN, Y.; SONG, H.; QIN, Y.; LI, R. Total synthesis of (\pm)-marinopyrrole A and Its library as potential antibiotic and anticancer agents. **J. Comb.Chem.**, v. 12, p. 541-547, 2010.

CHO, J. Y.; KWON, H. C.; WILLIAMS, P. G.; KAUFFMAN, C. A.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Actinofuranones A and B, polyketides from a marine-derived bacterium related to the genus *Streptomyces* (actinomycetales). **J. Nat. Prod.**, v. 69, p.425-428, 2006.

CHO, J. Y.; WILLIAMS, P. G.; KWON, H. C.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Lucentamycins A-D, cytotoxic peptides from the marine-derived actinomycete *Nocardiopsis lucentensis*. **J. Nat. Prod.**, v. 70, p. 1321-1328, 2007.

CHO, J. Y.; WILLIAMS, P. G.; KWON, H. C.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Lucentamycins A-D, cytotoxic peptides from the marine-derived actinomycete *Nocardiopsis lucentensis*. **J. Nat. Prod.**, v. 70, p.1321-1328, 2007.

CHO, J. Y.; KIM, M. S. Antibacterial benzaldehydes produced by seaweed-derived *Streptomyces atrovirens* PK288-21. **Fish. Sci.**, v. 78, p. 1065-1073, 2012.

CHOI, E.J.; KWON, H. C.; HAM, J.; YANG, H.O. 6-Hydroxymethyl-1-phenazine - carboxamide and 1, 6-phenazinedimethanol from a marine bacterium, *Brevibacterium* sp KMD 003, associated with marine purple vase sponge. **J. Antibiot.**, v. 62, p.621-624, 2009.

CHOI, Y.-H.; SOHN, J.-H.; LEE, D.; KIM, J. K.; KONG, I. S.; AHN, S. C.; OH, H. Chejuenolides A and B, new macrocyclic tetraenes from the marine bacterium *Hahella chejuensis*. **Tetrahedron**, v. 49, p. 7128-7131, 2008.

CLIFT, M. D.; THOMSON, R. J. Development of a merged conjugate addition / oxidative coupling sequence. application to the enantioselective total synthesis of metacycloprodigiosin and prodigiosin R1. **J. Am. Chem. Soc.**, v.131, p. 14579-14583, 2009.

- DASARI, V. R. R. K.; MUTHYALA, M. K. K.; NIKKU, M. Y.; DONTIREDDY, S. R. R. Novel pyridinium compound from marine actinomycete, *Amycolatopsis Alba* var. nov. dvr d4 showing antimicrobial and cytotoxic activities *in vitro*. **Microbiol. Res.**, v. 167, p. 346-351, 2012.
- DELONG, E. F. Modern microbial seascapes. **Nat. Ver. Microbiol.**, v. 5, p. 755-757, 2007.
- DESJARDINE, K.; PEREIRA, A.; WRIGHT, H.; MATAINAHO, T.; KELLY, M.; ANDERSEN, R. J. Tauramamide, a lipopeptide antibiotic produced in culture by *Brevibacillus laterosporus* isolated from a marine habitat: structure elucidation and synthesis. **J. Nat. Prod.**, v.70, 1850-1853, 2007.
- DICKSCHAT, J. S.; MARTENS, T.; BRINKHOFF, T.; SIMON, M.; SCHULZ, S. Volatiles released by a *Streptomyces* species isolated from the North Sea. **Chem. Biodiversity**, v. 2, p.837-865, 2005.
- DICKSCHAT, J. S.; REICHENBACH, H.; WAGNER-DOBLER, I.; SCHULZ, S. Novel pyrazines from the myxobacterium *Chondromyces crocatus* and marine bacteria. **Eur. J. Org. Chem.**, p. 4141-4153, 2005.
- DING, L.; MAIER, A.; FIEBIG, H-H.; LIN, W-H.; PESCHEL, G.; HERTWECK, C. Kandenols A–E, eudesmenes from an endophytic *Streptomyces* sp. of the mangrove tree *Kandelia candel*. **J. Nat. Prod.**, v.75, p.2223-2227, 2012.
- DING, L.; MÜNCH, J.; GOERLS, H.; MAIER, A.; FIEBIG, H. H.; LIU, W. H.; HERTWECK, C. Xiamycin, a pentacyclic indolosesquiterpene with selective anti-HIV activity from a bacterial mangrove endophyte. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 20, p. 6685-6687, 2010.
- DING, L.; PFOH, R.; RUHL, S.; QIN, S.; LAATSCH, H. T-muurolol sesquiterpenes from the marine *Streptomyces* sp. M491 and revision of the configuration of previously reported amorphanes. **J. Nat. Prod.**, v. 72, p. 99-101, 2009.
- DING, L.; MAIER, A.; FIEBIG, H. H.; GÖRLS, H.; LIN, W. H.; PESCHEL, G.; HERTWECK, C. Divergolides A-D from a mangrove endophyte reveal an unparalleled plasticity in ansa-macrolide biosynthesis. **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 50, p. 1630-1634, 2011.
- EL-GENDY, M. A. A.; SHAABAN, M.; EL-BONDKLY, A. M.; SHAABAN, K. A. Bioactive benzopyrone derivatives from new recombinant fusant of marine *Streptomyces*. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 150, p.85-96, 2008b.
- EL-GENDY, M. M. A.; SHAABAN, M.; SHAABAN, K. A.; EL-BONDKLY, A. M.; LAATSCH, H. A first triazolopyrimidine antibiotic isolated from nature. **J. Antibiot.**, v. 61, p. 149-157, 2008.
- ENGELHARDT, K.; DEGNE, K. F.; KEMMLER, M.; BREDHOLT, H.; FJAERVIK, E.; KLINKENBERG, G.; SLETTA, H.; ELLINGSEN, T. E.; ZOTCHEV, S. B. Production of a new thiopeptide antibiotic, TP-1161, by a marine *Nocardioopsis* species. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 76, p. 4969-4976, 2010.
-

EUSTÁQUIO, A. S.; NAM, S.-J.; PENN, K.; LECHNER, A.; WILSON, M. C.; FENICAL, W.; JENSEN, P. R.; MOORE, B. S. The discovery of salinosporamide k from the marine bacterium "*Salinispora pacifica*" by genome mining gives insight into pathway evolution. **ChemBioChem**, v. 12, p. 61-64, 2011.

FDHILA, F.; VAZQUEZ, V.; SANCHEZ, J. L.; RIGUERA, R. dd-diketopiperazines: antibiotics active against *Vibrio anguillarum* isolated from marine bacteria associated with cultures of *Pecten maximus*. **J. Nat. Prod.**, v. 66, p. 1299-1301, 2003.

FEHÉR, D.; BARLOW, R. S.; LORENZO, P. S.; HEMSCHEIDT, T. K. A 2-substituted prodiginine, 2-(p-hydroxybenzyl) prodigiosin, from *Pseudoalteromonas rubra*. **J. Nat. Prod.**, v. 71, p. 1970-1972, 2008.

FEHÉR, D.; BARLOW, R.; MCATEE, J.; HEMSCHEIDT, T. K. Highly Brominated Antimicrobial Metabolites from a Marine *Pseudoalteromonas* sp. **J. Nat. Prod.**, v. 73, p. 1963-1966, 2010.

FELING, R. H.; BUCHANAN, G. O.; MINCER, T. J.; KAUFFMAN, C. A.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Salinosporamide A: A highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium on the new genus *Salinispora*. **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 42, p. 355-357, 2003.

FENICAL, W. Marine Pharmaceuticals Past, Present, and Future. **Oceanography**, v. 19, No. 2, 2006.

FENICAL, W.; Chemical studies of marine bacteria: developing a new resource. **Chem. Rev.**, v.93, p. 1673-1683, 1993.

FENICAL, W.; JENSEN, P.R. Marine Microorganisms: A New Biomedical Resource. **Mar. Biotechnol.**, v.1, p. 419-457, 1993.

FERRARI, P.; COLOMBO, L.; STELLA, S.; SELVA, E.; ZERILLI, L.F. Antibiotic GE37468 A: A novel inhibitor of bacterial protein synthesis. II. Structure elucidation. **J. Antibiot.**, v. 48, p.1304-1311, 1995.

FIEDLER, H. P.; BRUNTNER, C.; RIEDLINGER, J.; BULL, A. T.; KNUTSEN, G.; GOODFELLOW, M.; JONES, A.; MALDONADO, L.; PATHOM-AREE, W.; BEIL, W.; SCHNEIDER, K.; KELLER, S.; SUSSMUTH, R. D. Proximicin A, B and C, novel aminofuran antibiotic and anticancer compounds isolated from marine strains of the actinomycete *Verrucosisspora*. **J. Antibiot.**, v.61, p.158-163, 2008.

FOLKMAN, J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. **Semin. Oncol.**, v. 29, p. 15-18, 2002.

FOTSO, S.; WU, S. J.; QIN, S.; LAATSCH, H. Marine Bacteria, XXXII: 5,7-Dihydroxy-5,6,7,8-tetrahydro-1H-azocin-2-one from a Marine-derived *Streptomyces* sp. **Nat. Prod. Commun.**, v. 1, p. 9-13, 2006.

- FRANKS, A.; HAYWOOD, P.; HOLMSTROM, C.; EGAN, S.; KJELLEBERG, S.; KUMAR, N. Isolation and structure elucidation of a novel yellow pigment from the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. **Molecules**, v. 10, p. 1286-1291, 2005.
- FREMLIN, L.; FARRUGIA, M.; PIGGOTT, A. M. KHALIL, Z.; LACEY, E.; CAPON, R. J. Reveromycins revealed: New polyketide spiroketals from Australian marine-derived and terrestrial *Streptomyces* spp. A case of natural products vs. artifacts. **Org. Biomol. Chem.**, v. 9, p. 1201-1211, 2011.
- FU, P.; WANG, S.; HONG, K.; LI, X.; LIU, P.; WANG, Y.; ZHU, W. Cytotoxic bipyridines from the marine - derived actinomycete *Actinoalloteichus cyanogriseus* WH1-2216-6. **J. Nat. Prod.**, v. 74, p. 1751-1756, 2011.
- FU, P.; YANG, C.; WANG, Y.; LIU, P.; MA, Y.; XU, L.; SU, M.; HONG, K.; ZHU, W. Streptocarbazoles A and B, two novel indolocarbazoles from the marine-derived actinomycete strain *Streptomyces* sp. FMA. **Org. Lett.**, v. 14(9), p. 2422-2425, 2012.
- FU, P.; ZHUANG, Y.; WANG, Y.; LIU, P.; QI, X.; GU, K.; ZHANG, D.; ZHU, W. New indolocarbazoles from a mutant strain of the marine-derived actinomycete *Streptomyces fradie* 007M135. **Org. Lett.**, v. 14(24), p. 6194-6197, 2012.
- FU, P.; LIU, P.; QU, H.; WANG, Y.; CHEN, D.; WANG, H.; LI, J.; ZHU, W. A-pyrones and diketopiperazine derivatives from the marine-derived actinomycete *Nocardioopsis dassonvillei* HR10-5. **J. Nat. Prod.**, v. 74, p.2219-2223, 2011.
- FUKUDA, T.; MILLER, E. D.; CLARK, B. R.; ALNAUMAN, A.; MURPHY, C. D.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Structures and biosynthesis of the pyridinopyrones, polyenepyrone from a marine-derived *Streptomyces* species. **J. Nat. Prod.**, v. 74, p. 1773-1778, 2011.
- FURSTNER, A. Chemistry and biology of roseophilin and the prodigiosin alkaloids: a survey of the last 2500 years. **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 42, p. 3582 - 3603, 2003.
- GAO, C.-H.; TIAN, X.-P.; QI, S.-H.; LUO, X.-M.; WANG, P.; ZHANG, S. Antibacterial and antilarval compounds from marine gorgonian-associated bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* SCSIO 00856. **J. Antibiot.**, v. 63, p. 191-193, 2010.
- GAO, X.; LU, Y.; XING, Y.; MA, Y.; LU, J.; BAO, W.; WANG, Y.; XI, T. A novel anticancer and antifungal phenazine derivative from a marine actinomycete BM-17. **Microbiol. Res.**, v. 167, p. 616-622, 2012.
- GÄRTNER, A.; OHLENDORF, B.; SCHULZ, D.; ZINECKER, H.; WIESE, J.; IMHOFF, J.F. Levantilides A and B, 20-membered macrolides from a *Micromonospora* strain isolated from the mediterranean deep sea sediment. **Mar Drugs**, v. 9, p. 98-108, 2011.
- GAUTHIER, G., GAUTHIER, M. AND CHRISTEN, R. Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella* and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and proposal of twelve new species combinations. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 45, p. 755-761, 1995.
-

GERBER, N. N.; GAUTHIER, M. J. New prodigiosin-like pigment from *Alteromonas rubra*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 37, p. 1176- 1179, 1979.

GERWICK, W. H.; MOORE, B. S. Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology. **Chem. Biol.**, v. 19, p. 85-98, 2012.

GORAJANA, A.; KURADA, B. V. V. S. N.; PEELA, S.; JANGAM, P.; VINJAMURI, S.; POLURI, E.; ZEECK, A. 1-Hydroxy-1-norresistomycin, a new cytotoxic compound from a marine actinomycete, *Streptomyces chibaensis* AUBN1/7. **J. Antibiot.**, v. 58, p. 526-529, 2005.

HAN, X.-X.; CUI, C.-B.; GU, Q.-Q.; ZHU, W.-M.; LIU, H.-B.; GU, J.-Y.; OSADA, H. ZHD-0501, a novel naturally occurring staurosporine analog from *Actinomadura* sp. 007. **Tetrahedron Lett.**, v. 46, p. 6137-6140, 2005.

HAN, Z.; XU, Y.; MCCONNELL, O.; LIU, L.; LI, L.; QI, S.; HUANG, X.; QIAN, P. Two antimycin a analogues from marine-derived actinomycete *Streptomyces lusitanus*. **Mar. Drugs**, v. 10, p. 668-676, 2012.

HAWAS, U.W.; SHAABAN, M.; SHAABAN, K. A.; SPEITLING, M.; MAIER, A.; KELTER, G.; FIEBIG, H. H.; MEINERS, M.; HELMKE, E.; LAATSCH, H. Mansouramycins A-D, cytotoxic isoquinolinequinones from a marine streptomycete. **J. Nat. Prod.**, v.72, p. 2120-2124, 2009.

HAYAKAWA, Y.; SHIRASAKI, S.; SHIBA, S.; KAWASAKI, T.; MATSUO, Y.; ADACHI, K.; SHIZURI, Y. Structures of new cytotoxic antibiotics, piericidins C7 and C8. **J. Antibiot.**, v. 60, p.201-203, 2007.

HERNANDEZ, I.L.C.; MACEDO, M.L.; BERLINCK, R.G.S.; FERREIRA, A.G.; GODINHO, M.J.L. Dipeptide metabolites from the marine derived bacterium *Streptomyces acrymicini*. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.15, p. 441-444, 2004.

HICKFORD, S. J. H.; KÜPPER, F. C.; ZHANG, G.; CARRANO, C.J.; BLUNT, J. W.; BUTLER, A. Petrobactin sulfonate, a new siderophore produced by the marine bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. **J.Nat. Prod.**, v. 67, p.1897-1899, 2004.

HIRSCH, P.; MEVS, U.; KROPPESTEDT, R. M.; SCHUMANN, P.; STACKEBRANDT, E. Cryptoendolithic actinomycetes from antarctic sandstone rock samples: *Micromonospora* endolithica sp. nov. and two isolates related to *Micromonospora coerulea* Jensen1932. **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 27, p.166-174, 2004.

HOFMANN, A. F.; HAGEY, L. R. Bile acids: Chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 65, p. 2461-2483, 2008.

HOMANN, V.V.; SANDY, M.; TINCU, J.A.; TEMPLETON, A.S.; TEBO, B.M.; BUTLER, A. Loihechelins A-F, a suite of amphiphilic siderophores produced by the marine bacterium *Halomonas* LOB-5. **J. Nat. Prod.**, v.72, p. 884-888, 2009.

HOSOYA, T.; HIROKAWA, T.; TAKAGI, M.; SHIN-YA, K. Trichostatin analogues JBIR-109, JBIR-110, and JBIR-111 from the marine sponge-derived *Streptomyces* sp. RM72. **J. Nat. Prod.**, v.75, p.285-289, 2012.

HOU, J.; LIU, P.; QU, H.; FU, P.; WANG, YI.; WANG, Z.; LI, Y.; TENG, X.; ZHU, W. Gilvocarcin HE: a new polyketide glycoside from *Streptomyces* sp. **J. Antibiot.**, v. 65, p. 523-526, 2012.

HU, Y and MacMILLAN, J. B. A new peptide isolated from a marine derived *Streptomyces bacillaris*. **Nat. Prod. Commun.**, v. 7(2), p. 211-214, 2012.

HU, Y.; LEGAKO, A. G.; ESPINDOLA, A. P. D. M.; MacMILLAN, J. B. Erythrolic acids A-E, meroterpenoids from marine-derived *Erythrobacter* sp. **J. Org. Chem.**, v. 77(7), p. 3401-3407, 2012.

HU, Y.; MACMILLAN, J. B. Erythrazoles A-B, "Cytotoxic benzothiazoles from a marine-derived *Erythrobacter* sp." **Org. Lett.**, v. 13, p. 6580-6583, 2011.

HU, Y.; MARTINEZ, E. D.; MACMILLAN, J. B. Anthraquinones from a marine-derived *Streptomyces spinoverrucosus*. **J. Nat. Prod.**, v.75, p. 1759-1764, 2012.

HUANG, H.; YANG, T.; REN, X.; LIU, J.; SONG, Y.; SUN, A.; MA, J.; WANG, B.; ZHANG, Y.; HUANG, C.; ZHANG, C.; JU, J. Cytotoxic angucycline class glycosides from the deep sea actinomycete *Streptomyces lusitanus* SCSIO LR32. **J. Nat. Prod.**, v.75, p.202-208, 2012.

HUANG, H.; YAO, Y.; HE, Z.; YANG, T.; MA, J.; TIAN, X.; LI, Y.; HUANG, C.; CHEN, X.; LI, W.; ZHANG, S.; ZHANG, C.; JU, J. Antimalarial β -carboline and indolactam alkaloids from *Marinactinospora thermotolerans*, a deep sea isolate. **J. Nat. Prod.**, v. 74, p. 2122-2127, 2011.

HUANG, Y.-F.; TIAN, L.; SUN, Y; PEI, Y.-H. Two new compounds from marine *Streptomyces* sp. FX-58. **J. Asian Nat. Prod. Res.**, v. 8, 495-498, 2006.

HUGHES, C. C.; KAUFFMAN, C. A.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Structures, reactivities, and antibiotic properties of the marinopyrroles A-F. **J. Org. Chem.**, v. 75, p. 3240-3250, 2010.

HUGHES, C. C.; MACMILLAN, J. B.; GAUDÊNCIO, S. P.; FENICAL, W.; LA CLAIR, J. J. Ammosamides A and B target myosin. **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 48, p.728-732, 2009.

HUGHES, C. C.; PRIETO-DAVO, A.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. The marinopyrroles, antibiotics of an unprecedented structure class from a marine *Streptomyces* sp. **Org. Lett.**, v. 10, p.629-631, 2008.

IGARASHI, Y.; SHIMASAKI, R.; MIYANAGA, S.; OKU, N.; ONAKA, H.; SAKURAI, H.; SAIKI, I.; KITANI, S.; NIHIRA, T.; W. WIMONSIRAVUDE, W.; PANBANGRED, W. Rakicidin D, an inhibitor of tumor cell invasion from marine-derived *Streptomyces* sp. **J. Antibiot.**, v. 63, p. 563-565, 2010.

IGARASHI, Y.; YANASE, S.; SUGIMOTO, K.; ENOMOTO, M.; MIYANAGA, S.; TRUJILLO, M. E.; SAIKI, I.; KUWAHARA, S. Lupinacidin C, an inhibitor of tumor cell invasion from *Micromonospora lupini*. **J. Nat. Prod.**, v.74, p. 862-865, 2011.

ISNANSETYO, A; KAMEI, Y. *Pseudoalteromonas phenolica* sp. nov., a novel marine bacterium that produces phenolic anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* substances. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 53, p. 583-588, 2003.

ITOH, T.; KINOSHITA, M.; AOKI, S.; KOBAYASHI, M. Komodoquinone A, a novel neutritogenic anthracycline, from marine *Streptomyces* sp. KS3. **J. Nat. Prod.**, v. 66, p. 1373-1377, 2003.

IWATA, F.; SATO, S.; MUKAI, T.; YAMADA, S.; TAKEO, J.; ABE, A.; OKITA, T.; KAWAHARA, H. Lorneic acids, trialkyl-substituted aromatic acids from a marine-derived actinomycete. **J. Nat. Prod.**, v. 72, p. 2046-2048, 2009.

IZUMIKAWA, M.; KHAN, S. T.; KOMAKI, H.; TAKAGI, M.; SHIN-YA, K. JBIR-31, a new teleocidin analog, produced by salt-requiring *Streptomyces* sp. **J. Antibiot.**, v. 63, p.33-36, 2010.

IZUMIKAWA, M.; KHAN, S. T.; TAKAGI, M.; SHIN-YA, K. Sponge-derived *Streptomyces* producing isoprenoids via the mevalonate pathway. **J. Nat. Prod.**, v.73, p.208-212, 2010.

IZUMIKAWA, M.; TAKAGI, M.; SHIN-YA, K. JBIR-78 and JBIR-95: Phenylacetylated peptides isolated from *Kibdelosporangium* sp. AK-AA56. **J. Nat. Prod.**, v.75, p.280-284, 2012.

JANG, J.-H.; KANO, K.; ADACHI, K.; MATSUDA, S.; SHIZURI, Y. Tenacibactins A-D, hydroxamate siderophores from a marine-derived bacterium, *Tenacibaculum* sp. A4K-17. **J. Nat. Prod.**, v. 70, p. 563-566, 2007.

JENSEN, H. L. Contributions to our knowledge of the actinomycetes. III. Further observations on the genus *Micromonospora*. **Proc. Linnean Soc. N.S.W.**, v. 57, p. 173-180, 1932.

JENSEN, P. R. ; FENICAL, W. Marine microorganisms and drug discovery: current status and future potential. Fusetani N (ed): **Drugs from the sea**. Basel, Karger, p. 6-29, 2000.

JENSEN, P. R.; MINCER, T. J.; WILLIAM, P. G.; FENICAL, W. Marine actinomycete diversity and natural product discovery. **Antoine van Leeuwenhoek**, v. 87, p. 43, 2005.

JENSEN, B. On the crystal structure of 5-oxo-6-N-methylformylamino-4,5-dihydro-1,2-dithiolo(4,3-b)pyrrole. **J. Antibiot.**, v.5, p.231-232, 1969.

JEONG, S.-Y.; SHIN, H. J.; KIM, T. S.; LEE, H.-S.; PARK, S.-K.; KIM, H. M. Streptokordin, a new cytotoxic compound of the methylpyridine class from a marine-derived *Streptomyces* sp. KORDI-3238. **J. Antibiot.**, v. 59, p. 234-240, 2006.

JEONG, S.-Y.; ISHIDA, K.; ITO, Y.; OKADA, S.; MURAKAMI, M. Bacillamide, a novel algicide from the marine bacterium, *Bacillus* sp. SY-1, against the harmful dinoflagellate, *Cochlodinium polykrikoides*. **Tetrahedron Lett.**, v. 44, p. 8005-8007, 2003.

JIMENEZ, A.; TIPPER, D.J.; DAVIES, J. Mode of action of thiolutin, an inhibitor of macromolecular synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.3, p.729-738, 1973.

JOHDO, O.; ISHIKURA, T.; YOSHIMOTO, A. Anthracycline metabolites from *Streptomyces violaceus* A262. I. Isolation of antibiotic-blocked mutants from *Streptomyces violaceus* A262. **J. Antibiot.**, v.44, p.1110-1120, 1991.

KADI, N.; CHALLIS, G. L. Siderophore biosynthesis a substrate specificity assay for nonribosomal peptide synthetase-independent siderophore synthetases involving trapping of acyl-adenylate intermediates with hydroxylamine. **Methods Enzymol.**, v. 458, p. 431-457, 2009.

KALINOVSKAYA, N. I.; KALINOVSKY, A. I.; ROMANENKO, L. A.; DMITRENOK, P. S.; KUZNETSOVA, T. A. New angucyclines and antimicrobial diketopiperazines from the marine mollusk-derived actinomycete *Saccharothrix espanaensis* An 113. **Nat. Prod. Commun.**, v. 5, p. 597-602, 2010.

KALINOVSKAYA, N. I.; KALINOVSKY, A. I.; ROMANENKO, L. A.; PUSHILIN, M. A.; DMITRENOK, P. S.; KUZNETSOVA, T. A. New angucyclinones from the marine mollusk-associated actinomycete *Saccharothrix espanaensis* An 113. **Nat. Prod. Commun.**, v. 3, p.1611-1616, 2008.

KANO, K.; MATSUO, Y.; ADACHI, K.; IMAGAWA, H.; NISHIZAWA, M.; SHIZURI, Y. Mechercharmycins A and B, cytotoxic substances from marine-derived *Thermoactinomyces* sp. YM3-251. **J. Antibiot.**, v. 58, p. 289-292, 2005.

KANO, K.; KAMINO, K.; LELEO, G.; ADACHI, K.; SHIZURI, Y. Pseudoalterobactin A and B, new siderophores excreted by marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. KP20-4. **J. Antibiot.**, v. 56, p. 871-875, 2003.

KAWAUCHI, K.; SHIBUTANI, K.; YAGISAWA, H.; KAMATA, H.; NAKATSUJI, S. ; ANZAI, H. ; YOKOYAMA, Y. ; IKEGAMI, Y.; MORIYAMA, Y.; HIRATA, H. A possible immunosuppressant, cycloprodigiosin hydrochloride, obtained from *Pseudoalteromonas denitrificans*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 237, p. 543-547, 1997.

KAYSSER, L.; BERNHARDT, P.; NAM, S.-J.; LOESGEN, S.; RUBY, G.; SKEWES-COX, P.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W.; MOORE, B. S. Merochlorins A-D, cyclic meroterpenoid antibiotics biosynthesized in divergent pathways with vanadium-dependent choroperoxidases. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 134, p.11988-11991, 2012.

KEKUDA, T.R.P.; SHOBHA, K. S.; ONKARAPPA, R. J. Fascinating diversity and potent biological activities of actinomycete metabolites. **Pharm. Res.**, v. 3, p. 250-256, 2010.

KELLER, N.P.; TURNER, G.; BENNETT, J.W. Fungal secondary metabolism from biochemistry to genomics. **Nat. Rev. Microbiol.**, v.3, p. 937-947, 2005.

KELLER, S.; NICHOLSON, G.; DRAHL, C.; SORENSEN, E.; FIEDLER, H.-P.; SUSSMUTH, R. D. Abyssomicins G and H and atrop-abyssomicin C from the marine *Verrucosipora* strain AB-18-032. **J. Antibiot.**, v. 60, p. 391-394, 2007.

KIM, D. G.; MOON, K.; KIM, S. H.; PARK, S. H.; PARK, S.; LEE, S. K.; OH, K. B.; SHIN, J.; OH, D. C. Bahamaolides A and B, antifungal polyene polyol macrolides from the marine actinomycete *Streptomyces* sp. **J. Nat. Prod.**, v.75, p. 959-967, 2012.

KIM, W. H.; JUNG, J. H.; LEE, E. Feigrisolide C: structural revision and synthesis. **J. Org. Chem.**, v. 70, p. 8190-8192, 2005.

KLEVENS, R. M.; MORRISON, M. A.; NADLE, J.; PETIT, S.; GERSHMAN, K.; RAY, S.; HARRISON, L. H.; LYNFIELD, R.; DUMYATI, G.; TOWNES, J. M.; CRAIG, A. S.; ZELL, E. R.; FOSHEIM, G. E.; MCDUGAL, L. K.; CAREY, R. B.; FRIDKIN, S.K. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the united states. **J. A. M. A.**, v. 298, p.1763-1771, 2007.

KOCK, I.; MASKEY, R. P.; BIABANI, M. A. F.; HELMKE, E.; LAATSCH, H. 1-Hydroxy-1-norresistomycin and resistoflavin methyl ether: new antibiotics from marine-derived streptomycetes. **J. Antibiot.**, v. 58, p. 530-534, 2005.

KOMANDROVA, N. A.; KOKOULIN, M. S.; ISAKOV, V. V.; TOMSHICH, S. V. ROMANENKO, L. A. Structure of the O-specific polysaccharide from a marine bacterium *Oceanisphaera litoralis* KMM 3654T containing ManNAcA. **Carbohydr. Res.**, v. 347, p. 178-181, 2012.

KONDRATYUK, T. P.; PARK, E-J.; YU, R.; BREEMEN, R. B. V.; ASOLKAR, R. N.; MURPHY, B. T.; FANICAL, W.; PEZZUTO, J. M. Novel marine phenazines as potential cancer chemopreventive and anti-inflammatory agents. **Mar. Drugs**, v. 10, p. 451-464, 2012.

KRICK, A.; KEHRAUS, S.; EBERL, L.; RIEDEL, K.; ANKE, H.; KAESLER, I.; GRAEBER, I.; SZEWZYK, U.; KONIG, G. M. A marine *Mesorhizobium* sp. produces structurally novel long-chain n-acyl-l-homoserine lactones. **Appl. Environ. Microbiol.**, v, 73, p. 3587-3594, 2007.

KRISS, A. E. *Micromonospora* actinomycete - like organism (*Micromonospora globosa*). **Mikrobiologiya**, v.8, p. 178-185, 1939.

KUNDIM, B. A.; ITOU, Y.; SAKAGAMI, Y.; FUDOU, R.; IIZUKA, T.; YAMANAKA, S.; OJIKI, M. New haliangicin isomers, potent antifungal metabolites produced by a marine myxobacterium. **J. Antibiot.**, v. 56, p. 630-638, 2003.

KWON, H. C.; ESPINDOLA, A. P. D. M.; PARK, J.-S.; PRIETO-DAVÓ, A.; ROSE, M.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Nitropyrrolins A–E, cytotoxic farnesyl- α -nitropyrroles from a

marine-derived bacterium within the actinomycete family *Streptomycetaceae*. **J. Nat. Prod.**, v. 73, p. 2047-2052, 2010.

KWON, H. C.; KAUFFMAN, C. A.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Marinisporolides, polyene-polyol macrolides from a marine actinomycete of the new genus "Marinispora". **J. Org. Chem.**, v.74, p. 675-684, 2009.

KWON, H. C.; KAUFFMAN, C. C.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Marinomycins A-D, antitumor-antibiotics of a new structure class from a marine actinomycete of the recently discovered genus "Marinispora". **J. Am. Chem. Soc.**, v. 128, p. 1622-1632, 2006.

LAATSCH, H.; FOTSO, S. Naturally occurring anthracyclines. **Top. Curr. Chem.**, v. 282, p. 3-74, 2008.

LABEDA, D. P. Multilocus sequence analysis of phytopathogenic species of the genus *Streptomyces*. **I. J. S. E. M.**, v. 61, p. 2525, 2010.

LEE, H.-S.; SHIN, H. J.; JANG, K. H.; KIM, T. S.; OH, K.-B.; SHIN, J. Cyclic peptides of the nocardamine class from a marine-derived bacterium of the genus *Streptomyces*. **J. Nat. Prod.**, v. 68, p. 623-625, 2005.

LEET, J. E.; LI, W.; AX, H. A.; MATSON, J. A.; HUANG, S.; HUANG, R.; CANTONE, J. L.; DREXLER, D.; DALTERIO, R. A.; LAM, K. S. Nocathiacins, new thiazolyl peptide antibiotics from *Nocardia* sp. II. Taxonomy, fermentation and biological activities. **J. Antibiot.**, v.56, p. 232, 2003.

LEWIS, S. M.; CORPE, W. A. Prodigiosin producing bacteria from marine sources. **Appl. Microbiol.**, v.12, p. 13-17, 1964.

LI, B.; CHEN, G.; BAI, J.; JING, Y.-K.; PEI, Y.-H. A bisamide and four diketopiperazines from a marine-derived *Streptomyces* sp. **J. Asian Nat. Prod. Res.**, v. 13, p. 1146-1150, 2011.

LI, D.; CARR, G.; ZHANG, Y.; WILLIAMS, D. E.; AMLANI, A.; BOTTRIPELL, H.; MUI, A. L.-F.; ANDERSEN, R. J. Turnagainolides A and B, cyclic depsipeptides produced in culture by a *Bacillus* sp.: isolation, structure elucidation, and synthesis **J. Nat. Prod.**, v. 74, p. 1093-1099, 2011.

LI, D.; WANG, F.; XIAO, X.; ZENG, X.; GU, Q.-Q.; ZHU, W. A new cytotoxic phenazine derivative from a deep sea bacterium *Bacillus* sp. **Arch. Pharm. Res.**, v. 30, p. 552-555, 2007.

LI, F.; MASKEY, R. P.; QIN, S.; SATTLER, I.; FIEBIG, H. H.; MAIER, A.; ZEECK, A.; LAATSCH, H. Chinikomycins A and B: isolation, structure elucidation, and biological activity of novel antibiotics from a marine *Streptomyces* sp. isolate M045. **J. Nat. Prod.**, v. 68, p. 349-353, 2005.

LI, H.; SHINDEL, P. B.; LEE, H. J.; YOO, E. S.; LEE, C. O.; HONG, J.; CHOI, S. H.; JUNG, J. H. Bile acid derivatives from a sponge - associated bacterium *Psychrobacter* sp. **Arch. Pharm. Res.**, v. 32, p. 857-862, 2009.

- LI, J.; LU, C.-H.; ZHAO, B.-B.; ZHENG, Z.-H.; SHEN, Y.-M. Phaeochromycins F-H, three new polyketide metabolites from *Streptomyces* sp. DSS-18. *Beilstein J. Org. Chem.*, v. 4, 2008.
- LI, K.; LI, Q. L.; JI, N.Y.; LIU, B.; ZHANG, W.; CAO, X. P. Deoxyuridines from the marine sponge associated actinomycete *Streptomyces microflavus*. *Mar. Drugs*, v. 9, p. 690-695, 2011.
- LI, S.; TIAN, X.; NIU, S.; ZHANG, W.; CHEN, Y.; ZHANG, H.; YANG, X.; ZHANG, W.; LI, W.; ZHANG, S.; JU, J.; ZHANG, C. Pseudonocardians A-C, new diazaanthraquinone derivatives from a deep-sea actinomycete *Pseudonocardia* sp. SCSIO 01299. *Mar. Drugs*, v. 9, p. 1428-1439, 2011.
- LI, W.; LEET, J. E.; AX, H. A.; GUSTAVSON, D. R.; BROWN, D. M.; TURNER, L.; BROWN, K.; CLARK, J.; YANG, H.; FUNG-TOMC, J.; LAM, K. S. Nocathiacins, new thiazolyl peptide antibiotics from *Nocardia* sp. I. Taxonomy, fermentation and biological activities. *J. Antibiot.*, v.56, p. 226-231, 2003.
- LI, X.-L.; XU, M.-J.; ZHAO, Y.-L.; XU, J. A novel benzo[f][1,7]naphthyridine produced by *Streptomyces albogriseolus* from mangrove sediments. *Molecules*, v.15, p. 9298-9307, 2010.
- LI, Y.; XU, Y.; LIU, L.; HAN, Z.; LAI, P. Y.; GUO, X.; ZHANG, X.; LIN, W.; QIAN, P.-Y. Five new amicoumacins isolated from a marine-derived bacterium *Bacillus subtilis*. *Mar. Drugs*, v. 10, p. 319-328, 2012.
- LIN, C.; LU, C.; SHEN, Y. Three new 2-pyranone derivatives from mangrove endophytic actinomycete strain *Nocardiopsis* sp. A00203. *Rec. Nat. Prod.*, v. 4, p. 176-179, 2010.
- LIN, Z.; ANTEMANO, R. R.; HUGHEN, R. W.; TIANERO, M. D. B.; PERAUD, O.; HAYGOOD, M. G.; CONCEPCION, G. P.; OLIVERA, B. M.; LIGHT, A.; SCHMIDT, E. W. Pulicatins A-E, neuroactive thiazoline metabolites from cone snail-associated bacteria. *J. Nat. Prod.*, v. 73, p. 1922-1926, 2010.
- LIN, Z.; REILLY, C. A.; ANTEMANO, R.; HUGHEN, R. W.; MARETT, L.; CONCEPCION, G. P.; HAYGOOD, M. G.; OLIVERA, B. M.; LIGHT, A.; SCHMIDT, E. W. Nobilamides A-H, long-acting transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) antagonists from mollusk-associated bacteria. *J. Med. Chem.*, v. 54, p. 3746-3755, 2011.
- LIN, Z.; FLORES, M.; FORTEZA, I.; HENRIKSEN, N. M.; CONCEPCION, G. P.; ROSENBERG, G.; HAYGOOD, M. G.; OLIVERA, B. M.; LIGHT, A. R.; CHEATHAM, T. E.; SCHMIDT, E. W. Totopotensamides, polyketide-cyclic peptide hybrids from a mollusk-associated bacterium *Streptomyces* sp. *J. Nat. Prod.*, v. 27, p. 644-649, 2012.
- LININGTON R.G.; GONZÁLES, J.; UREÑA L-D, R. L. I.; ORTEGA-BARRIA, E.; GERWICK, W. H. Venturamides A and B: antimalarial constituents of the Panamanian marine cyanobacterium *Oscillatoria* sp. *J. Nat. Prod.*, v. 70, p. 397-401, 2007.
-

LIU, L. L.; XU, Y.; HAN, Z.; LI, Y. X.; LU, L. L.; LAI, P. Y.; ZHONG, J. L.; GUO, X. R.; ZHANG, X. X.; QIAN, P. Y. Four new antibacterial xanthenes from the marine-derived actinomycetes *Streptomyces caelestis*. **Mar. Drugs**, v. 10, p. 2571-2583, 2012.

LORENTE, A.; PLA, D.; CANEDO, L. M.; ALBERICIO, F.; ALVAREZ, M. Isolation, structural assignment, and total synthesis of barmumycin. **J. Org. Chem.**, v.75, p. 8508-8515, 2010.

LU, J.; MA, Y.; LIANG, J.; XING, Y.; XI, T.; LU, Y. Aureolic acids from a marine-derived *Streptomyces* sp. WBF16. **Microbiol. Res.**, v.167, p. 590-595, 2012.

LU, X. L.; XU, Q. Z.; SHEN, Y. H.; LIU, X. Y.; JIAO, B. H.; ZHANG, W. D.; NI, K. Y. Macrolactin S, a novel macrolactin antibiotic from marine *Bacillus* sp. **Nat. Prod. Res.**, v.22, p. 342-347, 2008.

LU, Y.; XING, Y.; CHEN, C.; LU, J.; MAB, Y.; XI, T. Anthraquinone glycosides from marine *Streptomyces* sp. strain. **Phytochem. Lett.**, v. 5, p. 459-462, 2012.

LUEDEMANN, G. M.; CASMER, C. J. Electron microscope study of whole mounts and thin section of *Micromonospora chalceae* ATCC 12452. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 23, p. 243-255, 1973.

MA, Z.; WANG, N.; HU, J.; WANG, S. Isolation and characterization of a new iturinic lipopeptide, mojavensin A produced by a marine-derived bacterium *Bacillus mojavensis* B0621A. **J. Antibiot.**, v. 65, p. 317-322, 2012.

MACHERLA, V. R.; LIU, J.; BELLOWS, C.; TEISAN, S.; NICHOLSON, B.; LAM, K. S.; POTTS, B. C. M. Glaciapyrroles A, B, and C, pyrrolosesquiterpenes from a *Streptomyces* sp. isolated from an Alaskan marine sediment. **J. Nat. Prod.**, v. 68, p. 780-783, 2005.

MACHERLA, V. R.; LIU, J.; SUNGA, M.; WHITE, D. J.; GRODBERG, J.; TEISAN, S.; LAM, K. S.; POTTS, B. C. M. Lipoxazolidinones A, B, and C: antibacterial 4-oxazolidinones from a marine actinomycete isolated from a Guam marine sediment. **J. Nat. Prod.**, v. 70, p. 1454-1457, 2007.

MACLEOD, R. A. The question of the existence of specific marine bacteria. **Bacteriol. Rev.**, v. 29, p.9-23, 1965.

MAHAJAN, G.B.; GEORGE, S.D.; RANADIVE, P.V.; MISHRA, P.D.S.; EYYAMMADICHIYIL, S.S.; PANSHIKAR, R.M.; SAWANT, S.N.; KRISHNA, S.; SIVAKUMAR, M.; PARI, K.; THOMAS, B.M.; PATEL, Z.E.; VISHWAKARMA, R.; NAIK, C.G.; D'SOUZA, L.; DEVI, P. PM181104 and related antibacterial compounds, production, pharmaceutical compositions, and therapeutic use. **PCT Int. Appl. WO 2007119201A2**, 2009.

MALDONATO, M. Proteosome. **Encyclopedia of Stress**, p. 266-271, 2007.

MALONEY, K. N.; MACMILLAN, J. B.; KAUFFMAN, C. A.; JENSEN, P. R.; DIPASQUALE, A. G.; RHEINGOLD, A. L.; FENICAL, W. Lodopyridone, a structurally-unprecedented alkaloid from a marine actinomycete. **Org. Lett.**, v. 11, p. 5422-5424, 2009.

MANAM, R. R.; TEISAN, S.; WHITE, D. J.; NICHOLSON, B.; GRODBERG, J.; NEUTEBOOM, S. T. C.; LAM, K. S.; MOSCA, D. A.; LLOYD, G. K.; POTTS, B. C. M. Lajollamycin, a nitro-tetraene spiro- β -lactone- γ -lactam antibiotic from the marine actinomycete *Streptomyces nodosus*. **J. Nat. Prod.**, v. 68, p.240-243, 2005.

MANEERAT, S.; NITODA, T.; KANZAKI, H.; KAWAI, F. Bile acids are new products of a marine bacterium, *Myroides* sp. strain SM1. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.67, p. 679-683, 2005.

MANSSON, M.; NIELSEN, A.; KJAERULFF, L.; GOTFREDSEN, C. H.; WIETZ, M.; INGMER, H.; GRAM, L.; LARSEN, T. O. Inhibition of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus* by novel depsipeptides from a marine *Photobacterium*. **Mar. Drugs**, v. 9, p. 2537-2552, 2011.

MARFEY, P. Determination of D-amino acids. II. Use of a bifunctional reagent, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene. **Carlsberg Res. Commun.**, v. 49, p. 591-596, 1984.

MARTIN, G. D. A.; TAN, L. T.; JENSEN, P. R.; ENCARNACIÓN DIMAYUGA, R.; FAIRCHILD, C. R.; RAVENTOS-SUAREZ, C.; FENICAL, W. Marmycins A and B, cytotoxic pentacyclic C-glycosides from a marine sediment-derived actinomycete related to the genus *Streptomyces*. **J. Nat. Prod.**, v.70, p. 1406-1409, 2007.

MARTINEZ, J. S.; BUTLER, A. Marine amphiphilic siderophores: marinobactin structure, uptake, and microbial partitioning. **J. Inorg. Biochem.**, v.101, p. 1692-1698, 2007.

MASKEY, R.P.; HELMKE, E.; LAATSCH, H. Himalomycin A and B isolation and structure elucidation of new fridamycin type antibiotics from a marine *Streptomyces* isolate. **J. Antibiot.**, v. 56, p.942-949, 2003.

MASKEY, R.P.; LI, F.C.; QIN, S.; FIEBIG, H.H.; LAATSCH, H. Chandrananimycins A-C: production of novel anticancer antibiotics from a marine *Actinomadura* sp. isolate M048 by variation of medium composition and growth conditions. **J. Antibiot.**, v.56, p. 622-629, 2003.

MASKEY, R.P.; SEVVANA, M.; USÓN, I.; HELMKE, E.; LAATSCH, H. Gutingimycin: a highly complex metabolite from a marine streptomycete. **Angew. Chem. Int. Ed.**, v.43, p. 1281-1283, 2004.

MASKEY, R.P.; SEVVANA, M.; USÓN, I.; HELMKE, E.; LAATSCH, H. Parimycin: isolation and structure elucidation of a novel cytotoxic 2,3-dihydroquinizarin analogue of gamma-indomycinone from a marine streptomycete isolate. **J. Antibiot.**, v.55, p. 1031-1035, 2002.

MATSUDA, S.; ADACHI, K.; MATSUO, Y.; NUKINA, M.; SHIZURI, Y. Salinisporamycin, a novel metabolite from *Salinispora arenicola*. **J. Antibiot.**, v. 62, p. 519-526, 2009.

MATSUO, Y.; IMAGAWA, H.; NISHIZAWA, M.; SHIZURI, Y. Algal morphogenesis induced from an epiphytic marine bacterium. **Science**, v.307, p.1598, 2005.

- MATSUO, Y.; KANO, K.; IMAGAWA, H.; ADACHI, K.; NISHIZAWA, M.; SHIZURI, Y. Urukthapelstatin A, a novel cytotoxic substance from marine-derived *Mechercharimyces asporophorigenens* YM11-542. **J. Antibiot.**, v. 60, p. 251-255, 2007.
- MATSUO, Y.; KANO, K.; JANG, J.-H.; ADACHI, K.; MATSUDA, S.; MIKI, O.; KATO, T.; SHIZURI, Y. Streptobactin, a tricatechol-type siderophore from marine-derived *Streptomyces* sp. YM5-799. **J. Nat. Prod.**, v. 74, p. 2371-2376, 2011.
- MATSUO, Y.; SUZUKI, M.; KASAI, H.; SHIZURI, Y.; HARAYAMA, S. Isolation and phylogenetic characterization of bacteria capable of inducing differentiation in the green alga *Monostroma oxyspermum*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 5, p. 25-35, 2003.
- McARTHUR, K. A.; MITCHELL, S. S.; TSUENG, G.; RHEINGOLD, A.; WHITE, D. J.; GRODBERG, J.; LAM, K. S.; POTTS, B. C. Lynamycins A-E, chlorinated bisindole pyrrole antibiotics from a novel marine actinomycete. **J. Nat. Prod.**, v. 71, p. 1732-1737, 2008.
- MENZOROVA, N. I.; NEDASHKOVSKAYA, O. I.; KUZNETSOVA, T. A. Indolic metabolites from the new marine bacterium *Roseivirga echinicomitans* KMM 6058T. **Chem. Nat. Compd.**, v. 42, p. 713-717, 2006.
- MILLER, E. D.; KAUFFMAN, C. A.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Piperazimycins: cytotoxic hexadepsipeptides from a marine-derived bacterium of the genus *Streptomyces*. **J. Org. Chem.**, v. 72, p. 323-330, 2007.
- MITCHELL, S. S.; NICHOLSON, B.; TEISAN, S.; LAM, K. S.; POTTS, B. C. Aureoverticillactam, a novel 22-atom macrocyclic lactam from the marine actinomycete *Streptomyces aureoverticillatus*. **J. Nat. Prod.**, v. 67, p. 1400-1402, 2004.
- MITOVA, M. I.; LANG, G.; WIESE, J.; IMHOFF, J. F. Subinhibitory concentrations of antibiotics induce phenazine production in a marine *Streptomyces* sp. **J. Nat. Prod.**, v. 71, p. 824-827, 2008.
- MITOVA, M.; TOMMONARO, G.; DE ROSA, S. A novel cyclopeptide from a bacterium associated with the marine sponge *Ircinia muscarum*. **Z. Naturforsch.**, v. 58, p. 740-745, 2003.
- MITOVA, M.; TOMMONARO, G.; HENTSCHEL, U.; MULLER, W. E. G.; DE ROSA, S. Exocellular cyclic dipeptides from a *Ruegeria* strain associated with cell cultures of *Suberites domuncula*. **Mar. Biotechnol.**, v. 6, p. 95-103, 2004.
- MITOVA, M.; TUTINO, M. L.; INFUSINI, G.; MARINO, G.; DE ROSA, S. Exocellular peptides from Antarctic psychrophile *Pseudoalteromonas haloplanktis*. **Mar. Biotechnol.**, v. 7, p. 523-531, 2005.
- MOHAMMADIPANAH, F.; MATASYOH, J.; HAMED, J.; KLENK, H. P.; LAATSCH, H. Persipeptides A and B, two cyclic peptides from *Streptomyces* sp. UTMC 1154. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 20, p. 335-339, 2012.
-

MONDOL, M. A. M.; KIM, J. H.; LEE, M. A.; TAREQ, F. S.; LEE, H.-S.; LEE, Y.-J.; SHIN, H. J. Ieodomycins A-D, antimicrobial fatty acids from a marine *Bacillus* sp. **J. Nat. Prod.**, v. 74, p. 1606-1612, 2011.

MONDOL, M.A.M.; KIM, J.H.; LEE, H.S.; LEE, Y.J.; SHIN, H.J. Macrolactin W, a new macrolide from a marine *Bacillus* sp. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 21, p. 3832-3835, 2011.

MONDOL, M.A.M.; TAREQ, F.S.; KIM, J.H.; LEE, M.H.; LEE, Y.L.; LEE, J.S.; SHIN, H.J. Cyclic ether-containing macrolactins, antimicrobial 24-membered isomeric macrolactones from a marine *Bacillus* sp. **J. Nat. Prod.**, v. 74, p. 2582-2587, 2011.

MOTOHASHI, K.; INABA, K.; FUSE, S.; DOI, T.; IZUMIKAWA, M.; KHAN, S. T.; TAKAGI, M.; TAKAHASHI, T.; SHIN-YA, K. JBIR-56 and JBIR-57, 2(1H)-Pyrazinones from a marine sponge-derived *Streptomyces* sp. SpD081030SC-03. **J. Nat. Prod.**, v.74, p. 1630-1635, 2011.

MOTOHASHI, K.; IRIE, K.; TODA, T.; MATSUO, Y.; KASAI, H.; SUE, M.; FURIHATA, K.; SETO, H. Studies on terpenoids produced by actinomycetes. 5-dimethylallylindole -3 -carboxylic Acid and A80915G-8"-acid produced by marine-derived *Streptomyces* sp. MS239. **J. Antibiot.**, v.61, p. 75-80, 2008.

MOTOHASHI, K.; TAKAGI, M.; SHIN-YA, K. Tetracenoquinocin and 5-iminoaranciamycin from a sponge-derived *Streptomyces* sp. Sp080513GE-26. **J. Nat. Prod.**, v. 73, p. 755-758, 2010.

MOTOHASHI, K.; TODA, T.; SUE, M.; FURIHATA, K.; SHIZURI, Y.; MATSUO, Y.; KASAI, H.; SHIN-YA, K.; TAKAGI, M.; IZUMIKAWA, M.; HORIKAWA, Y.; SETO, H. Isolation and structure elucidation of tumescenamides A and B, two peptides produced by *Streptomyces tumescens* Ym23-260. **J. Antibiot.**, v. 63, p. 549-552, 2010.

MOTOHASHI, K.; TAKAGI, M.; SHIN-YA, K. Tetrapeptides possessing a unique skeleton, JBIR-34 and JBIR-35, isolated from a sponge-derived actinomycete, *Streptomyces* sp. Sp080513GE-23. **J. Nat. Prod.**, v.73, p. 226-228, 2010.

MURPHY, B. T.; NARENDER, T.; KAUFFMAN, C. A.; WOOLERY, W.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Saliniquinones A-F, new members of the highly cytotoxic anthraquinone-gamma-pyrone from the marine actinomycete *Salinispora arenicola*. **Aust. J. Chem.**, v. 63, p. 929-934, 2010.

NACHTIGALL, J.; SCHNEIDER, K.; BRUNTNER, C.; BULL, A. T.; GOODFELLOW, M.; ZINECKER, H.; IMHOFF, J. F.; NICHOLSON, G.; IRRAN, E.; SÜSSMUTH, R. D.; FIEDLER, H. P. Benzoxacystol, a benzoxazine-type enzyme inhibitor from the deep-sea strain *Streptomyces* sp. NTK 935. **J. Antibiot.**, v. 64, p. 453-457, 2011.

NAGAI, K.; KAMIGIRI, K.; ARAO, N.; SUZUMURA, K.-I.; KAWANO, Y.; YAMAOKA, M.; ZHANG, H.; WATANABE, M.; SUZUKI, K.; YM-266183 and YM-266184, novel thiopeptide antibiotics produced by *Bacillus cereus* isolated from a marine sponge. I. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical properties and biological properties. **J. Antibiot.**, v. 56, p. 123-128, 2003.

- NAM, S. J.; KAUFFMAN, C. A.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Isolation and characterization of actinoramides A-C, highly modified peptides from a marine *Streptomyces* sp. **Tetrahedron**, v. 67, p. 6707-6712, 2011.
- NAM, S.-J.; GAUDÊNCIO, S. P.; KAUFFMAN, C. A.; JENSEN, P. R.; KONDRATYUK, T. P.; MARLER, L. E.; PEZZUTO, J. M.; FENICAL, W. J. Fijiolides A and B, inhibitors of TNF- α induced NF κ B activation, from a marine-derived sediment bacterium of the genus *Nocardioopsis*. **J. Nat. Prod.**, v.73, p. 1080-1086, 2010.
- National Cancer Institute, disponível em:< www.dtp.nci.nih.gov sob NSC 47147-F> acesso em: 20, Dez. 2010.
- NEWTON, G. L.; JENSEN, P. R.; MACMILLAN, J.B.; FENICAL, W.; FAHEY, R. C. Low molecular weight thiols produced by a diverse group of marine actinomycetes. **Arch. Microbiol.**, v. 190, p. 547-557, 2008.
- NIELSEN, A.; MANSSON, M.; WIETZ, M.; VARMING, A. N.; PHIPPS, R. K.; LARSEN, T. O.; GRAM, L.; INGMER, H. Nigribactin, a novel siderophore from *Vibrio nigripulchritudo*, modulates *Staphylococcus aureus* virulence gene expression. **Mar. Drugs.**, v. 10, p. 2584-259, 2012.
- OH, D.-C.; GONTANG, E. A.; KAUFFMAN, C. A.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Salinipyrones and pacificanones, mixed-precursor polyketides from the marine actinomycete *Salinispora pacifica*. **J. Nat. Prod.**, v.71, p. 570-575, 2008.
- OH, D.-C.; STRANGMAN, W. K.; KAUFFMAN, C. A.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Thalassospiramides A and B, immunosuppressive peptides from the marine bacterium *Thalassospira* sp. **Org. Lett.**, v. 9, p. 1525-1528, 2007.
- OH, D.-C.; WILLIAMS, P. G.; KAUFFMAN, C. A.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Cyanosporasides A and B, chloro- and cyano-cyclopenta[a]indene glycosides from the marine actinomycete “*Salinispora pacifica*”. **Org. Lett.**, v. 8, p. 1021-1024, 2006.
- OH, Y. S. & PARK, A. *Pseudoalteromonas donghaensis* sp. nov., isolated from seawater. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 61, p. 351, 2011.
- OHLENDORF, B.; SCHULZ, D.; ERHARD, A.; NAGEL, K.; IMHOFF, J. F. Geranylphenazinediol, an acetylcholinesterase inhibitor produced by a *Streptomyces* species. **J. Nat. Prod.**, v. 75, p. 1400–1404, 2012.
- OKU, N.; KAWABATA, K.; ADACHI, K.; KATSUTA, A.; SHIZURI, Y. Unnarmicins A and C, new antibacterial depsipeptides produced by marine bacterium *Photobacterium* sp. MBIC06485. **J. Antibiot.**, v. 61, p. 11-17, 2008.
- OKU, N.; KAWABATA, K.; ADACHI, K.; KATSUTA, A.; SHIZURI, Y. Ariakemicins A and B, novel polyketide-peptide antibiotics from a marine gliding bacterium of the genus
- OLENIKOVA, G. K.; IVCHUK, O. I.; DENISENKO, V. A.; CHAIKINA, E. L.;
-

ØRSKOV, J. Investigations into the morphology of the Ray Fungi. **Levin & Munksgaard**, 1923.

OVERBYE, K.M.; BARRETT, J.F. Antibiotics: where did we go wrong? **Drug Discovery Today**, v. 10, p. 45-52, 2005.

PAN, E.; JAMISON, M.; YOUSUFUDDIN, M.; MacMILLAN, J. Ammosamide D, an oxidatively ring opened ammosamide analog from a marine-derived *Streptomyces variabilis*. **Org. Lett.**, v. 14(9), p. 2390-2393, 2012.

PANDEYA, R.; CHANDERB, R.; SAINIS, K. B. Prodigiosins, a novel family of immunosuppressants with anti-cancer activity. **Indian. J. Biochem. Biophys.**, v. 44, p. 295-302, 2007.

PARK, S. C.; KIM, C. J.; URAMOTO, M.; YUN, H. I.; YOON, K. H.; OH, T. K. Antibacterial substance produced by *Streptococcus faecium* under anaerobic culture. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v. 59, p. 1966-1967, 1995.

PCT Int. Appl., WO 2005000880 A2 20050106, 2005.

PELÁEZ, F. The historical delivery of antibiotics from microbial natural products - Can history repeat? **Biochem. Pharmacol.**, v. 71, p. 981-990, 2006.

PÉREZ, M.; CRESPO, C.; SCHLEISSNER, C.; RODRÍGUEZ, P.; ZÚÑIGA, P.; REYES, F. Tartrolon D, a cytotoxic macrodiolide from the marine - derived actinomycete *Streptomyces* sp. MDG-04-17-069. **J. Nat. Prod.**, v.72, p. 2192-2194, 2009.

PÉREZ, M.; CRESPO, C.; SCHLEISSNER, C.; RODRÍGUEZ, P.; ZÚÑIGA, P.; REYES, F. Tartrolon D, a cytotoxic macrodiolide from the marine-derived actinomycete *Streptomyces* sp. MDG-04-17-069. **J. Nat. Prod.**, v. 72, p. 2192-2194, 2009.

PETTIT, G. R.; KNIGHT, J. C.; HERALD, D. L.; PETTIT, R. K.; HOGAN, F.; MUKKU, V. J.; HAMBLIN, J. S.; DODSON, M. J.; CHAPUIS, J. C. Antineoplastic agents. 570. Isolation and structure elucidation of bacillistatins 1 and 2 from a marine *Bacillus silvestris*. **J. Nat. Prod.**, v.72, p.366-371, 2009.

PHIPPS, R. K.; BLUNT, J. W.; COLE, A. L. J.; MUNRO, M. H. G. Anthracycline derivatives from a marine-derived New Zealand *Streptomyces*. **ARKIVOC**, p. 94-100, 2004.

PIMENTEL-ELARDO, S. M.; BUBACK, V.; GULDER, T.A.M.; BUGNI, T.M.; REPPART, J.; BRINGMANN, G.; IRELAND, C.M.; SCHIRMEISTER T.; HENTSCHEL.U. New tetromycin derivatives with anti-trypanosomal and protease inhibitory activities. **Mar. Drugs**, v. 9, p.1682-1697, 2011.

PIMENTEL-ELARDO, S. M.; GULDER, T.A.M.; HENTSCHEL.U.; BRINGMANN, G. Cebulactams A1 and A2, new macrolactams isolated from *Saccharopolyspora cebuensis*, the first obligate marine strain of the genus *Saccharopolyspora*. **Tetrahedron Lett.**, v. 49, p.6889-6892, 2008.

QUÉVRAIN, E.; DOMART-COULON, I.; PERNICE, M.; BOURGUET- KONDRACKI, M. L. Novel natural parabens produced by a *Microbulbifer* bacterium in its calcareous sponge host *Leuconia nivea*. **Environ. Microbiol.**, v. 11, p. 1527-1539, 2009.

QUITSCHAU, M.; SCHUHMANN, T.; PIEL, J.; VON ZEZSCHWITZ, P.; GROND, S. The new metabolite (*S*)-cinnamoylphosphoramidate from *Streptomyces* sp. and its total synthesis. **Eur. J. Org. Chem.**, p.5117-5124, 2008.

RAJU, R.; PIGGOTT, A. M.; CONTE, M. M.; CAPON, R. J. Heronamides A-C, new polyketide macrolactams from an Australian marine-derived *Streptomyces* sp. A biosynthetic case for synchronized tandem electrocyclization. **Org. Biomol. Chem.**, v. 8, p. 4682-4689, 2010.

RAJU, R.; PIGGOTT, A. M.; CONTE, M.; AALBERSBERG, W. G. L.; FEUSSNER, K.; CAPON, R. J. Nasesezines A and B: A new dimeric diketopiperazine framework from a marine-derived actinomycete, *Streptomyces* sp. **Org. Lett.**, v. 11, p. 3862-3865, 2009.

RAJU, R.; PIGGOTT, A. M.; DIAZ, L. X. B.; KHALIL, Z.; CAPON, R. J. Heronapyrroles A-C: farnesylated 2-nitropyrroles from an Australian marine-derived *Streptomyces* sp. **Org. Lett.**, v. 12, p. 5158-5161, 2010.

RAJU, R.; PIGGOTT, A. M.; HUANG, X. C.; CAPON, R. J. Nocardioazines: A novel bridged diketopiperazine scaffold from a marine-derived bacterium inhibits p-glycoprotein. **Org. Lett.**, v. 13, p. 2770-2773, 2011.

RAJU, R.; PIGGOTT, A. M.; KHALIL, Z.; BERNHARDT, P. V.; CAPON, R. J. Heronamycin A: a new benzothiazine ansamycin from an Australian marine-derived *Streptomyces* sp. **Tetrahedron Lett.**, v.53, p. 1063-1065, 2012.

RAJU, R.; RAWABATA, K.; NISHIJIMA, M.; AALBERSBERG, W. G. L. Kailuin F, a new cyclic acyldepsipeptide from a marine-derived bacterium. **Tetrahedron Lett.**, v. 53, p. 6905-6907, 2012.

Rapidithrix. **Org. Lett.**, vol. 10, p. 2481-2484, 2008.

REED, K.A.; RAO MANAM, R.; MITCHELL, S.S.; XU, J.; TEISAN, S.; CHAO, T.H.; DEYANAT-YAZDI, G.; NEUTEBOOM, S.T.C.; LAM, K.S.; POTTS, B.C.M. Salinosporamides D-J from the marine actinomycete *Salinispora tropica*, bromosalinosporamide, and thioester derivatives are potent inhibitors of the 20S proteasome. **J. Nat. Prod.**, v. 70, p. 269, 2007.

RIEDLINGER, J.; REICKE, A.; ZÄHNER, H.; KRISMER, B.; BULL, A.T.; MALDONADO, L.A.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M.; BISTER, B.; BISCHOFF, D.; SÜSSMUTH, R. D.; FIEDLER, H.P. Abyssomicins, inhibitors of the para-aminobenzoic acid pathway produced by the marine *Verrucosipora* strain AB-18-032. **J. Antibiot.**, v. 57, p. 271-279, 2004.

RODRIGUEZ, J. C.; FERNÁNDEZ PUENTES, J. L.; PÉREZ BAZ, J.; CANEDO, L. M. A new cytotoxic polycyclic xanthone produced by a marine-derived *Actinomadura*. II.

Isolation, physico-chemical properties and structure determination. **J. Antibiot.**, v.56, p. 318-321, 2003.

ROMERO, F.; ESPLIEGO, F.; PÉREZ BAZ, J.; GARCÍA DE QUESADA, T.; GRÁVALOS, D.; DE LA CALLE, F.; FERNÁNDEZ-PUENTES, J. L. Thiocoraline, a new depsipeptide with antitumor activity produced by a marine *Micromonospora*. I. Taxonomy, fermentation, isolation, and biological activities. **J. Antibiot.**, v.50, p.734-737, 1997.

ROMERO, P.; MALET, L.; CANEDO, L. M.; CUEVAS, C.; REYES, J. F.

RUNGPROM, W.; SIWU, E. R. O.; LAMBERT, L. K.; DECHSAKULWATANA, C.; BARDEN, M. C.; KOKPOL, U.; BLANCHFIELD, J. T.; KITA, M.; GARSON, M. J. Cyclic tetrapeptides from marine bacteria associated with the seaweed *Diginea* sp. and the sponge *Halisarca ectofibrosa*. **Tetrahedron**, v. 64, p. 3147-3152, 2008.

RUNGPROM, W.; SIWU, E. R. O.; LAMBERT, L. K.; DECHSAKULWATANA, C.; BARDEN, M. C.; KOKPOL, U.; BLANCHFIELD, J. T.; KITA, M.; GARSON, M. J. Cyclic tetrapeptides from marine bacteria associated with the seaweed *Diginea* sp. and the sponge *Halisarca ectofibrosa*. **Tetrahedron**, v. 64, p. 3147-3152, 2008.

SALAS-SEGURA, D. A. Reporte de un caso de infección por *Kocuria rosea*. **Acta Méd. Costarric.**, v. 49, p. 170-170, 2007.

SÁNCHEZ LÓPEZ, J. M.; MARTINEZ INSUA, M.; PÉREZ BAZ, J.; FERNÁNDEZ PUENTES, J. L.; CANEDO HERNÁNDEZ, L. M. New cytotoxic indolic metabolites from a marine *Streptomyces*. **J. Nat. Prod.**, v.66, p. 863-863, 2003.

SANDY, M.; HAN, A.; BLUNT, J.; MUNRO, M.; HAYGOOD, M.; BUTLER, A. Vanchrobactin and anguibactin siderophores produced by *Vibrio* sp. DS40M4. **J. Nat. Prod.**, v. 73, p. 1038-1043, 2010.

SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, disponível em <<http://www.scbt.com/pt/datasheet-202298-prodigiosin.html>>, acessado em 14, abr. 2013.

SASAKI, T.; OHTANI, T.; MATSUMOTO, H.; UNEMI, N.; HAMADA, M.; TAKEUCHI, T.; HORI, M. MJ347-81F4 A & B, novel antibiotics from *Amycolatopsis* sp.: taxonomic characteristics, fermentation, and antimicrobial activity. **J. Antibiot.**, v.51, p. 715-721, 1998.

SATO, S. ; IWATA, F.; YAMADA, S.; KATAYAMA, M. Neomaclafungins A–I: oligomycin-class macrolides from a marine-derived actinomycete. **J. Nat. Prod.**, v.75, p. 1974–1982, 2012.

SATO, S.; IWATA, F.; MUKAI, T.; YAMADA, S.; TAKEO, J.; ABE, A.; KAWAHARA, H. Indoxamycins A–F. Cytotoxic tricyclic polypropionates from a marine-derived actinomycete. **J. Org. Chem.**, v. 74, p. 5502-5509, 2009.

SATO, S.; IWATA, F.; YAMADA, S.; KAWAHARA, H. 3,6,7-Tri-epi-invictolide, a diastereomer of queen recognition pheromone, and its analog from a marine-derived actinomycete. **J. Antibiotic.**, v.64, p. 385-389, 2011.

SATO, S.; IWATA, F.; MUKAI, T.; YAMADA, S.; TAKEO, J.; ABE, A.; KAWAHARA, H. Indoxamycins A-F. Cytotoxic tricyclic polypropionates from a marine-derived actinomycete. **J. Org. Chem.**, v.74, p. 5502-5509, 2009.

SATO, S.; IWATA, F.; YAMADA, S.; KAWAHARA, H.; KATAYAMA, M. Usabamycins A-C: new anthramycin-type analogues from a marine-derived actinomycete. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 21, p. 7099-7101, 2011.

SCHLEISSNER, C.; PÉREZ, M.; LOSADA, A.; RODRÍGUEZ, P.; CRESPO, C.; ZÚNIGA, P.; FERNÁNDEZ, R.; REYES, F.; DE LA CALLE, F. Antitumor actinopyranones produced by *Streptomyces albus* POR-04-15-053 isolated from a marine sediment. **J. Nat. Prod.**, v. 74, p. 1590-1596, 2011.

SCHNEEMANN, I.; KAJAHN, I.; OHLENDORF, B.; ZINECKER, H.; ERHARD, A.; NAGEL, K.; WIESE, J.; IMHOFF, J. F. Mayamycin, a cytotoxic polyketide from a *Streptomyces* strain isolated from the marine sponge *Halichondria panicea*. **J. Nat. Prod.**, v. 73, p. 1309-1312, 2010.

SCHNEEMANN, I.; OHLENDORF, B.; ZINECKER, H.; NAGEL, K.; WIESE, J.; IMHOFF, J. F. Nocapyrones A-D, gamma-pyrones from a *Nocardiopsis* strain isolated from the marine sponge *Halichondria panicea*. **J. Nat. Prod.**, v. 73, p. 1444-1447, 2010.

SCHNEIDER, K.; KELLER, S.; WOLTER, F. E.; ROGLIN, L.; BEIL, W.; SEITZ, O.; NICHOLSON, G.; BRUNTNER, C.; RIEDLINGER, J.; FIEDLER, H.-P.; SUSSMUTH, R. D. Proximicins A, B, and C-antitumor furan analogues of netropsin from the marine actinomycete *Verrucosisspora* induce upregulation of p53 and the cyclin kinase inhibitor p21. **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 47, p. 3258-3261, 2008.

SCHULTZ, A. W.; LEWIS, C. A.; LUZUNG, M. R.; BARAN, P. S.; MOORE, B. S. Biosynthesis and engineering of cyclomarin and cyclomarazine: Prenylated, non-ribosomal cyclic peptides of marine actinobacterial origin. **J. Nat. Prod.**, v.73, p. 373-377, 2010.

SCHULTZ, A. W.; OH, D.-C.; CARNEY, J. R.; WILLIAMSON, R. T.; UDWARY, D. W.; JENSEN, P. R.; GOULD, S. J.; FENICAL, W.; MOORE, B. S. Biosynthesis and structures of cyclomarins and cyclomarazines, prenylated cyclic peptides of marine actinobacterial origin. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 130, p. 4507-4516, 2008.

SCHULTZ, A.; OH, D.-C.; CARNEY, J. R.; WILLIAMSON, T.; UDWARY, D. W.; JENSEN, P. R.; GOULD, S. J.; FENICAL, W.; MOORE, B. S. Biosynthesis and structures of cyclomarins and cyclomarazines, prenylated cyclic peptides of marine actinobacterial origin. **J. Amer. Chem. Soc.**, v. 130, p. 4507-4516, 2008.

SCHUMACHER, R. W.; TALMAGE, S. C.; MILLER, S. A.; SARRIS, K. E.; DAVIDSON, B. S.; GOLDBERG, A. Isolation and structure determination of an antimicrobial ester from a marine sediment derived bacterium **J. Nat. Prod.**, v. 66, p. 1291-1293, 2003.

SEO, C. & OH, H. Chejuenolide C: A new macrocyclic metabolite from the marine bacterium *Hahella chejuensis*. **Bull. Korean Chem. Soc.**, v. 30, p. 1181-1183, 2009.

SHAABAN, K. A. SHAABAN, M.; FACEY, P.; FOTSO, S.; FRAUENDORF, H.; HELMKE, E.; MAIER, A.; FIEBIG, H. H.; LAATSCH, H.; electrospray ionization mass spectra of piperazimycins A and B and γ -butyrolactones from a marine-derived *Streptomyces* sp. **J. Antibiot.**, v. 61, p. 736, 2008.

SHAABAN, K. A.; HELMKE, E.; KELTER, G.; FIEBIG, H. H.; LAATSCH, H. Glucopiericidin C: a cytotoxic piericidin glucoside antibiotic produced by a marine *Streptomyces* isolate. **J. Antibiot.**, v. 64, p. 205-209, 2011.

SHAABAN, K. A.; SHEPHERD, M. D.; AHMED, T. A.; NYBO, S. E.; LEGGAS, M.; ROHR, J. Pyramidamycins A-D and 3-hydroxyquinoline-2-carboxamide; cytotoxic benzamides from *Streptomyces* sp. DGC1. **J. Antibiot.**, v. 65, p. 615-622, 2012.

SHINDO, K.; MIKAMI, K.; TAMESADA, E.; TAKAICHI, S.; ADACHI, K.; MISAWA, N.; MAOKA, T. Diapolycopenedioic acid xylosyl ester, a novel glyco-C30-carotenoic acid produced by a new marine bacterium *Rubritalea squalenifaciens*. **Tetrahedron Lett.**, v. 48, p. 2725-2727, 2007.

SHINDO, K.; ASAGI, E.; SANO, A.; HOTTA, E.; MINEMURA, N.; MIKAMI, K.; TAMESADA, E.; MISAWA, N.; MAOKA, T. Diapolycopenedioic acid xylosyl esters A, B, and C, novel glyco-C30-carotenoic acids produced by a new marine bacterium *Rubritalea squalenifaciens*. **J. Antibiot.**, v.61, p.185-191, 2008.

SHIRAI, M.; OKUDA, M.; MOTOHASHI, K.; IMOTO, M.; FURIHATA, K.; MATSUO, Y.; KATSUTA, A.; SHIZURI, Y.; SETO, H. Terpenoids produced by actinomycetes: isolation, structural elucidation and biosynthesis of new diterpenes, gifhornenolones A and B from *Verrucosipora gifhornensis* YM28-088. **J. Antibiot.**, v. 63, p. 245-250, 2010.

SILVA, F. *Kocuria* spp. **Rev. Chil. Infectol.**, vol.29, p. 215-216, 2012.

SIMMONS, L.; KAUFMANN, K.; GARCIA, R.; SCHWAR, G.; HUCH, V.; MULLER, R. Bendigoles D-F, bioactive sterols from the marine sponge-derived *Actinomadura* sp. SBMs009. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 19, p. 6570-6575, 2011.

SOBIK, P.; GRUNENBERG, J.; BOROCZKY, K.; LAATSCH, H. WAGNER-DOBLER AND, I.; SCHULZ, S. Identification, synthesis, and conformation of tri- and tetrathiacycloalkanes from marine bacteria. **J. Org. Chem.**, v. 72, p. 3776-3782, 2007.

SOCHA, A. M.; GARCIA, D.; SHEFFER, R.; ROWLEY, D. C. Antibiotic bisanthraquinones produced by a streptomycete isolated from a cyanobacterium associated with *Ecteinascidia turbinata*. **J. Nat. Prod.**, v. 69, p. 1070-1073, 2006.

SOENGAS, R. G.; ANTA, C.; ESPADA, A.; PAZ, V.; ARES, I. R.; BALADO, M.; RODRÍGUEZ, J.; LEMOS, M. L.; JIMENEZ, C. Structural characterization of vanchrobactin, a new catechol siderophore produced by the fish pathogen *Vibrio anguillarum* serotype O2. **Tetrahedron Lett.**, v.47, p. 7113-7116, 2006.

SOLANKI, R.; KHANNA, M.; RUP LAL, R. Bioactive compounds from marine actinomycetes. **Indian. J. Microbiol.**, v. 48, p.410-431, 2008.

SOLOVIEVA, N.K. Actinomycetes os littoral and sub. Littoral zones of the White Sea. **Antibiotik**, v.17, p. 778-781, 1972.

SOLOVIEVA, N.K.; SINGAL, E. M. Some data on ecology of *Micromonospora*. **Antibiotik.**, v. 17, p. 387-392, 1972.

SORIA-MERCADO, I. E.; PRIETO-DAVO, A.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Antibiotic terpenoid chloro-dihydroquinones from a new marine actinomycete. **J. Nat. Prod.**, v. 68, p. 904-910, 2005.

SOUSA, T. S.; JIMENEZ, P. C.; FERREIRA, E. G.; SILVEIRA, E. R.; BRAZ-FILHO, R.; PESSOA, O. D. L.; COSTA-LOTUFO, L. V. Anthracyclines from *Micromonospora* sp. **J. Nat. Prod.**, v. 75, p. 489-493, 2012.

SPEITLING, M.; SMETANINA, O. F.; KUZNETSOVA, T. A.; LAATSCH, H. Bromoalterochromides A and A', unprecedented chromopeptides from a marine *Pseudoalteromonas maricaloris* strain KMM 636T. **J. Antibiot.**, v.60, p. 36-42, 2007.

SPYERE, A.; ROWLEY, D. C.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. New neoverrucosane diterpenoids produced by the marine gliding bacterium *Saprospira grandis*. **J. Nat. Prod.**, v.66, p. 818-822, 2003.

STRANGMAN, W. K.; KWON, H. C.; BROIDE, D.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Potent inhibitors of pro-inflammatory cytokine production produced by a marine-derived bacterium. **J. Med. Chem.**, v. 52, p. 2317-2327, 2009.

STRITZKE, K.; SCHULZ, S.; LAATSCH, H.; HELMKE, E.; BEIL, W. Novel caprolactones from a marine streptomycete. **J. Nat. Prod.**, v. 67, p. 395-401, 2004.

SUN, P.; MALONEY, K. N.; NAM, S.-J.; HASTE, N. M.; RAJU, R.; AALBERSBERG, W.; JENSEN, P. R.; NIZET, V.; HENSLER, M. E.; FENICAL, W. Fijimycins A-C, three antibacterial etamycin-class depsipeptides from a marine-derived *Streptomyces* sp. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 19, p. 6557-6562, 2011.

SUPONG, K.; THAWAI, C.; SUWANBORIRUX, K.; CHOOWONG, W.; SUPOTHINA, S.; PITTAYAKHAJONWUT, P. Antimalarial and antitubercular C-glycosylated benz[a]anthraquinones from the marine-derived *Streptomyces* sp. BCC45596. **Phytochem. Lett.**, v.5, p. 651-656, 2012.

SUZUMURA, K.-I.; YOKOI, T.; FUNATSU, M.; NAGAI, K.; TANAKA, K.; ZHANG, H.; SUZUKI, K. M-266183 and YM-266184, novel thiopeptide antibiotics produced by *Bacillus cereus* isolated from a marine sponge II. Structure elucidation. **J. Antibiot.**, v. 56, p. 129-134, 2003.

TAKAGI, M.; MOTOHASHI, K.; IZUMIKAWA, M.; KHAN, S. T.; HWANG, J.-H.; SHIN-YA, K. JBIR-66, a new metabolite isolated from tunicate-derived *Saccharopolyspora* sp. SS081219JE-28. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 74, p. 2355-2357, 2010.

- TAKAGI, M.; MOTOHASHI, K.; IZUMIKAWA, M.; KHAN, S. T.; HWANG, J. -H.; SHIN-YA, K. JBIR-66, a new metabolite isolated from tunicate-derived *Saccharopolyspora* sp. SS081219JE-28. **Biosci. Biotechnol., Biochem.**, v.74, p. 2355-2357, 2010.
- TAKEUCHI, T.; HAMADA, M.; NANAGAWA, H.; TAKAHASHI, Y.; SAWA, R. **Jpn. Kokai Tokkyo Koho**, JP 96216484, 1998.
- TAKEUCHI, T.; HAMADA, M.; OSANAWA, H.; TAKAHASHI, Y.; SAWA, R. **Jpn. Kokai Tokkyo Koho**, JP 08165286, 1996.
- TAMAOKI, T.; SHIRAHATA, K.; IIDA, T.; TOMITA, F. Trioxacarcins, novel antitumor antibiotics II. Isolation, physico-chemical properties and mode of action. **J. Antibiot.**, v. 34, p. 1525-1530, 1981.
- TAREQ, F. S.; KIM, J. H.; LEE, M. A.; LEE, H-S.; LEE, Y-J.; LEE, J. S.; SHIN, H. J. Ieodoglucomides A and B from marine-derived bacterium *Bacillus licheniformis*. **Org. Lett.**, v. 14(6), p. 1464-1467, 2012.
- TARMAN, K.; PALM, G. J.; PORZEL, A.; MERZWEILER, K.; ARNOLD, N.; WESSJOHANN, L. A.; UNTERSEHER, M.; LINDEQUIST, U. Helicascolide C, a new lactone from an Indonesian marine algicolous strain of *Daldinia eschscholzii* (Xylariaceae, Ascomycota). **Phytochem. Lett.**, v.5, p. 83-86, 2012.
- TAVARES, W. Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos. 2.ed, São Paulo: Editora Atheneu, p. 792, 1999.
- TIPPER, D. J. Inhibition of yeast ribonucleic acid polymerases by thiolutin. **J. Bacteriol.**,v.116, p.245-256, 1973.
- TOMITA, F.; TAMAOKI, T.; MORIMOTO, M.; FUJIMOTO, K. Trioxacarcins, novel antitumor antibiotics I. Producing organism, fermentation and biological activities. **J. Antibiot.**, v. 34, p.1519-1524, 1981.
- TSUDA, M.; MUGISHIMA, T.; KOMATSU, K.; SONE, T.; TANAKA, M.; MIKAMI, Y.; SHIRO, M.; HIRAI, M.; OHIZUMI, Y.; KOBAYASHI, J. Tetrahedron, 2003, 59, 3227.
- UEDA, J.; KHAN, S. T.; TAKAGI, M.; SHIN-YA, K. JBIR-58, a new salicylamide derivative, isolated from a marine sponge-derived *Streptomyces* sp. SpD081030ME-02. **J. Antibiot.**, v. 63, p. 267-269, 2010.
- UZAIR, B.; AHMED, N.; AHMAD, V. U.; MOHAMMAD, F. V.; EDWARDS, D. H.; The isolation, purification and biological activity of a novel antibacterial compound produced by *Pseudomonas stutzeri*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 279, p. 243-250, 2008.
- VALENTE, A. M. M. P.; BOFFO, E. F. ; FERREIRA, A. G. Complete NMR Assignments of a new prodigiosin isolated from *Streptomyces violaceusniger*. **Ann. Magn. Reson.**, v. 7, p. 44-54, 2008.
-

VON DAEHNE, W.; GODTFREDSSEN, W. O.; TYBRING, L.; SCHAUMBURG, K. New antibiotics containing the 1,2-dithiolo[4,3-b]pyrrole ring system. **J. Antibiot.**, v. 22, p. 233-236, 1969.

VRASPIR, J.M.; HOLT, P.D.; BUTLER, A. Identification of new members within suites of amphiphilic marine siderophores. **Biometals**, v. 24, p. 85-92, 2011.

WANG, F.; TIAN, X.; HUANG, C.; LI, Q.; ZHANG, S. Marinactinones A-C, new γ -pyrones from marine actinomycete *Marinactinospora thermotolerans* SCSIO 00606. **J. Antibiot.**, v. 64, p. 189-192, 2011.

WANG, F.; XU, M.; LI, Q.; SATTLER, I.; LIN, W. *p*-Aminoacetophenonic acids produced by a mangrove endophyte *Streptomyces* sp. (strain HK10552). **Molecules**, v. 15, p. 2782-2790, 2010.

WANG, L.; GROSSE, T.; STEVENS, H.; BRINKHOFF, T.; SIMON, M.; LIANG, L.; BITZER, J.; BACH, G.; ZEECK, A.; TOKUDA, H.; LANG, S. Bioactive hydroxyphenylpyrrole-dicarboxylic acids from a new marine *Halomonas* sp. Production and structure elucidation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 72, p. 816-822, 2006.

WASSERMAN, H. H.; MCKEON, J. E.; SMITH, L.; FORGIONE, P. Prodigiosin, structure and partial synthesis. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 82, p. 506, 1960.

WEBSTER, J. M.; LI, J.; CHEN, G. Anticancer property of dithiolo[4,3-b]pyrrolones. U.S. Patent 6020360, 2000.

WEI, R.-B.; XI, T.; LI, J.; WANG, P.; LI, F.-C.; LIN, Y.-C.; QIN, S. Lobophorin C and D, new kijanimicin derivatives from a marine sponge-associated actinomycetal strain AZS17. **Mar. Drugs**, v. 9, p. 359-368, 2011.

WEYLAND, H. Actinomycetes in North sea and Atlantic Ocean sediments. **Nature**, v.233, p.858, 1969.

WIETZ, M.; MANSSON, M.; GOTTFREDSSEN, C. H.; LARSEN, T. O.; GRAM, L. Antibacterial compounds from marine *Vibrionaceae* isolated on a global expedition. **Mar. Drugs**, v. 8, p. 2946-60, 2010.

WILLIAMS P. G.; MILLER E. D.; ASOLKAR R. N.; JENSEN P. R.; FENICAL W. Arenicolides A-C, 26-membered ring macrolides from the marine actinomycete *Salinispora arenicola*. **J. Org. Chem.**, v.72, p. 5025-5034, 2007.

WILLIAMS, D. E.; DALISAY, D. S.; LI, F.; AMPHLETT, J.; MANEERAT, W.; CHAVEZ, M. A. G.; WANG, Y. A.; MATAINAHU, T.; YU, W.; BROWN, P. J.; ARROWSMITH, C. H.; VEDADI, M.; ANDERSEN, R. J. Nahuoic acid a produced by a *Streptomyces* sp. isolated from a marine sediment Is a selective sam-competitive inhibitor of the histone methyltransferase SETD8. **Org. Lett.**, v. 15, p. 414-417, 2012.

WILLIAMS, D. E.; DALISAY, D. S.; PATRICK, B. O.; MATAINAHU, T.; ANDRUSIAK, K.; DESHPANDE, R.; MYERS, C. L.; PIOTROWSKI, J. S.; BOONE, C.; YOSHIDA, M.; ANDERSON, R. J. Padanamides A and B, highly modified linear tetrapeptides produced in

culture by a *Streptomyces* sp. isolated from a marine sediment. **Org. Lett.**, v. 13, p. 3936-3939, 2011.

WILLIAMS, P. G.; BUCHANAN, G.O.; FELING, R. H.; KAUFFMAN, C. A.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. New cytotoxic salinosporamides from the marine actinomycete *Salinispora tropica*. **J. Org. Chem.**, v. 70, p. 6196-6203, 2005.

WILLIAMSON, N. R.; FINERAN, P. C.; LEEPER, F. J.; SALMOND, G. P. C. Anticancer and immunosuppressive properties of bacterial prodiginines. **Future Microbiol.**, v. 2, p. 605-618, 2006.

WILLIAMSON, N. R.; FINERAN, P. C.; LEEPER, F. J.; SALMOND, G. P. C. The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines. **Nature**, v.4, p. 887-899, 2006.

WILSON, M. C.; NAM, S. J.; GULDER, T. A.; KAUFFMAN, C. A.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W.; MOORE, B. S. Structure and biosynthesis of the marine streptomycete ansamycin ansalactam A and its distinctive branched chain polyketide extender unit. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 133, p. 1971-1977, 2011.

WINTER, J. M.; MOFFITT, M. C.; ZAZOPOULOS, E.; MCALPINE, J. B.; DORRESTEIN, P. C.; MOORE, B. S. Molecular basis for chloronium-mediated meroterpene cyclization. Cloning, sequencing, and heterologous expression of the napyradiomycin biosynthetic gene cluster. **J. Biol. Chem.**, v. 282, 16362- 16368, 2007.

WU, S. J.; FOTSO, S.; LI, F.; QIN, S.; KELTER, G.; FIEBIG, H.H.; LAATSCH, H. N-Carboxamido-staurosporine and Selina-4(14),7(11)-diene-8,9-diol, new metabolites from a marine *Streptomyces* sp. **J. Antibiot.**, v. 59, p. 331-337, 2006.

WU, S. J.; FOTSO, S.; LI, F.; QIN, S.; LAATSCH, H. Amorphane sesquiterpenes from a marine *Streptomyces* sp. **J. Nat. Prod.**, v.70, p. 304-306, 2007.

WYCHE, T. P.; HOU, Y.; VAZQUEZ-RIVERA, E.; BRAUN, D.; BUGNI, T. S. Peptidolipins B–F, antibacterial lipopeptides from an ascidian-derived *Nocardia* sp. **J. Nat. Prod.**, v. 75, p. 735–740, 2012.

WYCHE, T. P.; HOU, Y.; BRAUN, D.; COHEN, H. C.; XIONG, M. P.; BUGNI, T. S. "First natural analogs of the cytotoxic thiodepsipeptide thiocoraline a from marine *Verrucosispora* sp." **J. Org. Chem.**, v. 76, p. 6542-6547, 2011.

XIE, X. C.; MEI, W. L.; ZHAO, Y. X.; HONG, K.; DAI, H. F. A new degraded sesquiterpene from marine actinomycete *Streptomyces* sp. 0616208. **Chin. Chem. Lett.**, v. 17, p. 1463-1465, 2006.

XIE, Z. P.; ZHANG, H. Y.; LI, F. C.; LIU, B.; YANG, S. X.; WANG, H. P.; PU, Y.; CHEN, Y.; QIN, S. A new isobenzofuranone derivative from a marine *Streptomyces* sp., **Chin. Chem. Lett.**, v. 23, p. 941-944, 2012.

XIE, Z.; LIU, B.; WANG, H.; YANG, S.; ZHANG, H.; WANG, Y.; JI, N.; QIN, S.; LAATSCH, H. Kiamycin, a unique cytotoxic angucyclinone derivative from a marine *Streptomyces* sp. **Mar. Drugs**, v. 10, p. 551-558, 2012.

- XIN, W.; YE, X.; YU, S.; LIAN, X-Y.; ZHANG, Z. New capoamycin-type antibiotics and polyene acids from marine *Streptomyces fradiae* PTZ0025. **Mar. Drugs**, v. 10, p. 2388-2402, 2012.
- XU, L.Y.; QUAN, X.S.; WANG, C.; SHENG, H.F.; ZHOU, G.X.; LIN, B.R.; JIANG, R.W.; YAO, X.S. Antimycins A (19) and A (20), two new antimycins produced by marine actinomycete *Streptomyces antibioticus* H74-18. **J. Antibiot.**, v.64, p.661-665, 2011.
- XU, M-J.; LIU, X-J.; ZHAO, Y-L.; LIU, D.; XU, Z-H.; LANG, X-M.; AO, P.; LIN, W-H.; YANG, S-L.; ZHANG, Z-G.; XU, J. Identification and characterization of an anti-fibrotic benzopyran compound isolated from mangrove-derived *Streptomyces xiamenensis*. **Mar. Drugs**, v. 10, p. 639-654, 2012.
- XU, X. W.; WU, Y. H.; WANG, C. S.; GAO, X. H.; WANG, X. G.; WU, M. *Pseudoalteromonas lipolytica* sp. nov., isolated from the Yangtze River estuary. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.60, p. 2176, 2010.
- YAMADA, T.; KIKUCHI, T.; TANAKA, R.; NUMATA, A. Halichoblelides B and C, potent cytotoxic macrolides from a *Streptomyces* species separated from a marine fish., **Tetrahedron Lett.**, v. 53, p. 2842-2846, 2012.
- YANG, S.-W.; CHAN, T.-M.; TERRACCIANO, R. P.; LOEBENBERG, D.; CHEN, G.; PATEL, M.; GULLO, V.; PRAMANIK, B.; CHU, M. Structure elucidation of Sch 725674 from *Aspergillus* sp. **J. Antibiot.**, v. 57, p. 601-604, 2004.
- YAO, C. B. F. F.; AL-ZEREINI, W.; FOTSO, S.; ANKE, H.; LAATSCH, H. Aqabamycins A-G: novel nitro maleimides from a marine *Vibrio* species: II. Structure elucidation. **J. Antibiot.**, v. 63, p. 303-308, 2010.
- YAO, C. B. F.; SCHIEBEL, M.; HELMKE, E.; ANKE, H.; LAATSCH, H. Prefluostatin and new urauchimycin derivatives produced by *Streptomyces* isolates. **Z. Naturforsch.**, v. 61, p. 320- 325, 2006.
- YONEZAWA, K.; YAMADA, K.; KOUNO, I. New diketopiperazine derivatives isolated from sea urchin derived *Bacillus* sp. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 59, p. 106-108, 2011.
- YOU, M.-X.; ZHANG, H.-P.; HU, C.-Q. Isolation and Characterization of three siderophores from marine bacteria. **Chin. J. Chem.**, v. 26, p.1332-1334, 2008.
- YU, L. L.; LI, Z-Y.; PENG, C-S.; LI, Z-Y.; GUO, Y-W. Neobacillamide A, a novel thiazole-containing alkaloid from the marine bacterium *Bacillus vallismortis* C89, associated with south china sea sponge dysidea avara. **Helv. Chim. Acta**, v. 92, p. 607-612, 2010.
- YUAN, G.; LIN, H.; WANG, C.; HONG, K.; LIU, Y.; LI, J. ¹H and ¹³C Assignments of two new macrocyclic lactones isolated from *Streptomyces* sp. 211726 and revised assignments of azalomycins F3a, F4a and F5a. **Magn. Reson. Chem.**, v. 49, p. 30-37, 2011.
- ZACHARSKI, L. R.; SUKHATME, V. P. Coley's toxin revisited: immunotherapy or plasminogen activator, therapy of cancer? **J. Thromb. Haemost.**, v. 3, p. 424 - 427, 2004.
-

ZHANG, H.; LEE, Y.K.; ZHANG, W.; LEE, H.K. Culturable actinobacteria from the marine sponge *Hymeniacidon perleve*: isolation and phylogenetic diversity by 16S rRNA gene-RFLP analysis. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.90, p. 159-69, 2006.

ZHANG, H.; WANG, H.; CUI, H.; LI, Z.; XIE, Z.; PU, Y.; LI, F.; QIN, S. A New anthracene derivative from marine *Streptomyces* sp. W007 exhibiting highly and selectively cytotoxic activities. **Mar. Drugs**, v. 9, p. 1502-1509, 2011.

ZHANG, H.L.; HUA, H.M.; PEI, Y.H.; YAO, X.S. Three new cytotoxic cyclic acylpeptides from marine *Bacillus* sp. **Chem. Pharm. Bull.**, v.52, p.1029-1030, 2004.

ZHANG, Q.; LI, S.; CHEN, Y.; TIAN, X.; ZHANG, H.; ZHANG, G.; ZHU, Y.; ZHANG, S.; ZHANG, W.; ZHANG, C. New diketopiperazine derivatives from a deep-sea-derived *Nocardiosis Alba* SCSIO 03039. **J. Antibiot.**, v. 66, p.31-36, 2012.

ZHANG, W.; LIU, Z.; LI, S.; LU, Y.; CHEN, Y.; ZHANG, H.; ZHANG, G.; ZHU, Y.; ZHANG, G.; ZHANG, W.; LIU, J.; ZHANG, C. Fluostatins I–K from the south China sea-derived *Micromonospora rosaria* SCSIO N160. **J. Nat. Prod.**, v.75, p.1937-1943, 2012.

ZHANG, W.; LIU, Z.; LI, S.; YANG, T.; ZHANG, Q.; MA, L.; TIAN, X.; ZHANG, H.; HUANG, C.; ZHANG, S.; JU, J.; SHEN, Y.; ZHANG, C. Spiroindimicins A-D: new bisindole alkaloids from a deep-sea-derived actinomycete. **Org. Lett.**, v. 14(13), p. 3364-3367, 2012.

ZHAO, H.; KASSAMA, Y.; YOUNH, M.; KELL, D. B.; GOODACRE, R. Differentiation of *Micromonospora* isolates from a coastal sediment in wales on the basis of fourier transform infrared spectroscopy, 16S rRNA sequence analysis, and the amplified fragment length polymorphism technique. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, p. 6619-6627, 2004.

ZHOU, X.; HUANG, H.; CHEN, Y.; TAN, J.; SONG, Y.; ZOU, J.; TIAN, X.; HUA, Y.; JU, J. Marthiapeptide A, an anti-infective and cytotoxic polythiazole cyclopeptide from a 60l scale fermentation of the deep sea-derived *Marinactinospora therrmotolerans* SCSIO 00652. **J. Nat. Prod.**, v. 75 (12), p. 2251-2255, 2012.

ZHURAVLEVA, O. I.; AFIYATULLOV, S. S.; ERMAKOVA, S. P.; NEDASHKOVSKAYA, O. I.; DMITRENOK, P. S.; DENISENKO, V. A.; KUZNETSOVA, T. A. New C 14 -surfactin methyl ester from the marine bacterium *Bacillus pumilus* KMM 456. **Russ. Chem. Bull.**, v. 59, p. 2137-2142, 2010.

Artigos completos publicados em periódicos

Studies on the Secondary Metabolites of a *Pseudoalteromonas* sp. Isolated from Sediments Collected at the Northeastern Coast of Brazil

by Isabelle D. B. Arthaud^{a)}), Felipe A. R. Rodrigues^{a)}), Paula C. Jimenez^{a)}), Raquel C. Montenegro^{c)}, Alysson L. Angelim^{d)}, Vânia M. M. Maciel^{a)}), Edilberto R. Silveira^{c)}, Hozana P. S. Freitas^{c)}, Thiciana S. Sousa^{c)}, Otilia D. L. Pessoa^{c)}, Tito M. C. Lotufo^{a)}, and Letícia V. Costa-Lotufo^{*a)})

^{a)} Instituto de Ciências do Mar, LABOMAR, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil (phone: +55-85-33668255; fax: +55-85-33668333; e-mail: costalotufo@gmail.com)

^{b)} Laboratório de Oncologia Experimental, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

^{c)} Laboratório de Genética Humana e Médica, ICB, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil

^{d)} Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

^{e)} Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

Continuing search for anticancer compounds from the marine environment, we have studied microorganisms that inhabit intertidal sediments of the northeastern Brazilian coast. Of the 32 strains isolated, 13 were selected for biological evaluation of their crude extracts. The acetate extract obtained from a *Gram*-negative bacterium was strongly active against cancer cell lines with IC_{50} values that ranged from 0.04 (HL60 leukemia cells) to 0.26 $\mu\text{g/ml}$ (MDA MB-435 melanoma cells). The bacterium was identified as a *Pseudoalteromonas* sp. based on 16S rRNA gene sequencing. A bioassay-guided fractionation of the active extract led to the isolation of prodigiosin, a well-known tripyrrole red pigment with immunosuppressive and anticancer activities. Further experiments with ErbB-2 overexpressing cell lines, including HB4a-C3.6 (moderate overexpression), HB4a-C5.2 (high overexpression), and the parental HB4a cell line, were performed. Prodigiosin was moderately active toward HB4a cells with an IC_{50} of 4.6 $\mu\text{g/ml}$, while it was 115 and 18 times more active toward HB4a-C3.6 cells (IC_{50} of 0.04 $\mu\text{g/ml}$) and HB4a-C5.2 (IC_{50} of 0.26 $\mu\text{g/ml}$) cells, respectively. These data suggest that, in spite of its previously described apoptosis-inducing properties, prodigiosin can selectively recognize cells overexpressing ErbB-2, which could be highly appealing in human breast cancer therapy.

Introduction. – The oceans cover *ca.* 70% of the Earth's surface and represent a highly complex microbiological environment where abundances can reach values as high as 10^6 microorganisms/ml of seawater and $10^9/\text{cm}^3$ of ocean-bottom sediment [1][2]. This microbiota has recently been realized to be a prolific source of secondary metabolites [1][3]. Two compounds therein originated, salinosporamide A and NPI-2358, are examples of successful drug candidates [4–7].

Due to their great chemical and biological diversity and the perceived sustainability associated with the possibility of fermentation as a resource to rescue a large amount of bioactive compounds for preclinical and clinical studies, marine microorganisms may have revolutionary implications on the natural-product sciences [3]. In addition, marine natural products present an extraordinary diversity of molecular targets and a

high degree of selectivity, which highlight their therapeutic and pharmacological potential [8][9].

In this context, this study is a pioneering assessment of the biodiversity and biotechnological potential of microorganisms associated with sediments from the northeastern coast of Brazil. This region of the Brazilian coast has already demonstrated a high degree of endemism for marine invertebrates [10][11]. However, until now, there have been no studies with its marine microorganism communities. Thus, here we report the isolation and cultivation of microorganisms from sediments collected in the intertidal zone of Taíba Beach (São Gonçalo do Amarante, Ceará, Brazil), followed by an anticancer screening. The bioassay-guided fractionation of the extract of the most active bacterium led to the isolation of prodigiosin as the active principle along with non-active compounds, the bile acid derivatives deoxycholic acid and cholic acid. Several fatty acids were also identified in the nonpolar fractions of the AcOEt extract. Additional experiments were performed to assess the activity of prodigiosin, which is already known for its anticancer properties [12][13], against ErbB-2-over-expressing breast cells.

Results. – *Strain Isolation, Cultivation, Extraction, and Screening.* Thirty-two strains were isolated from sediment samples collected at Taíba beach, but only 13 were selected for extraction and cytotoxic screening. Among these, four demonstrated some biological activity and inhibited tumor cell proliferation at 50 µg/ml (*Fig. 1*). The most active extract was obtained by AcOEt extraction from the spent media of strain BRA-007, which inhibited almost 100% of the growth of all tested cell lines at 50 µg/ml.

Preliminary morphological characterization of this organism indicated that the isolate was a red marine, obligate, *Gram*-negative bacterium. Based on alignment of its 16S rRNA sequence from the *GenBank* database, the gene sequence of the isolate showed highest similarity to that of *Pseudoalteromonas rubra* (99% similarity). Based on this information, the *EzTaxon* server 2.1 was used to align the isolate's sequence with *Pseudoalteromonas* type strains. Similarity values with *P. rubra* reached 99.68%. The phylogenetic analysis warrants inclusion within the *Pseudoalteromonas* clade and also indicates that *P. rubra* is a sister taxon with a bootstrap value of 97 (*Fig. 2*).

Bioassay-Guided Fractionation of Prodigiosin. The AcOEt extract obtained from BRA-007 was cytotoxic toward the four tumor cell lines tested with IC_{50} values ranging from 0.51 (HL-60 cells) to 3.05 µg/ml (MDA-MB-435 cells). This extract was submitted to successive replicates of preparative silica gel high-performance thin layer chromatography to yield prodigiosin (**1**; *Fig. 3*). All the chemical procedures were guided by the cytotoxic activities of the obtained fractions. The results are compiled in the *Table*. As expected, prodigiosin was strongly active toward tumor cell lines with IC_{50} values ranging from 0.05 to 0.19 µg/ml.

A second set of experiments was performed using ErbB-2 overexpressing cell lines, HB4a-C3.6 (moderate overexpression), HB4a-C5.2 (high overexpression), and the parental cell line HB4a, to assess the cytotoxic activity of prodigiosin and to determine whether this compound could differentially recognize these cells. Indeed, prodigiosin was moderately active toward HB4a cells (IC_{50} of 4.6 µg/ml), while it was 115 and 18 times more active toward HB4a-C3.6 (IC_{50} of 0.04 µg/ml) and HB4a-C5.2 (IC_{50} of 0.26 µg/ml) cells, respectively.

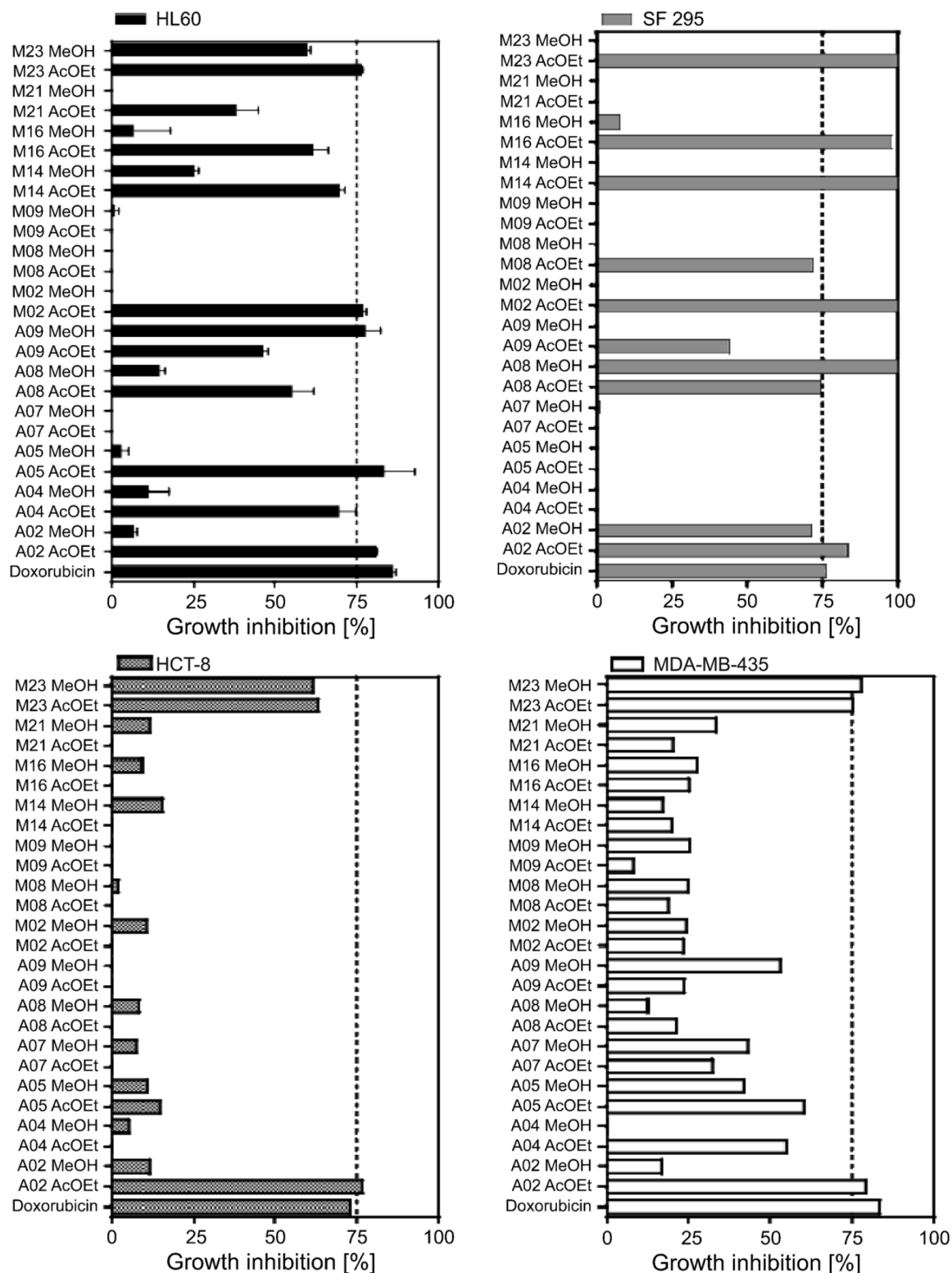


Fig. 1. Single-dose cytotoxic activity of the microorganism extracts evaluated against SF-295 (glioblastoma), HCT-8 (colon cancer), MDA-MB-435 (melanoma), and HL-60 (promyelocytic leukemia) cell lines (at 50 $\mu\text{g/ml}$) using the Alamar assay after 72 h of incubation. Data are represented as a percentage of growth inhibition relative to untreated cells. Doxorubicin was used as a positive control.

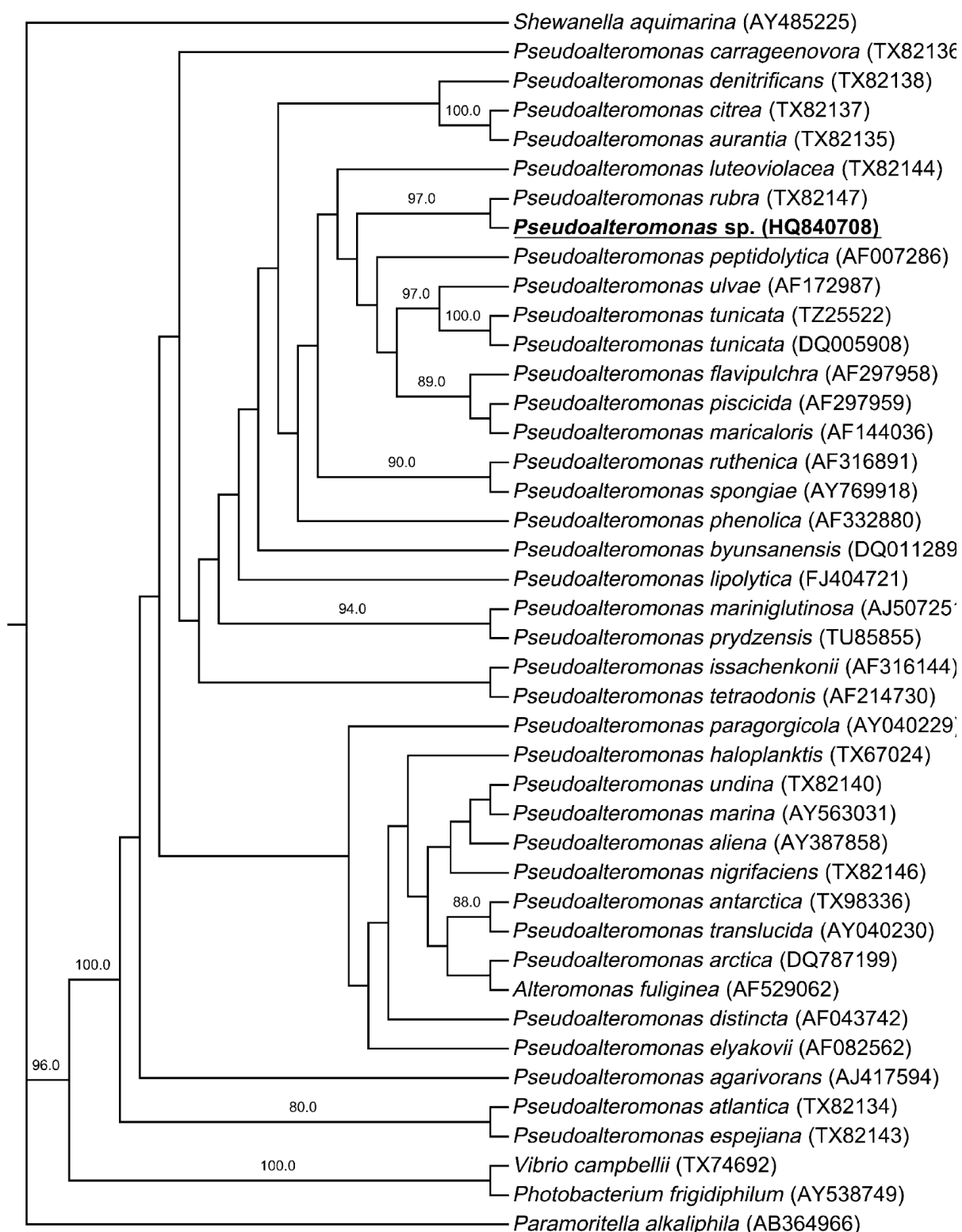


Fig. 2. Phylogenetic tree showing the location of the new isolate (bold) among different *Pseudoalteromonas* and related species. The numbers at the branches represent bootstrap values (100 bootstrap samplings, only values larger than 80 are shown). The *GenBank* accession No. for each reference species is shown in parentheses.

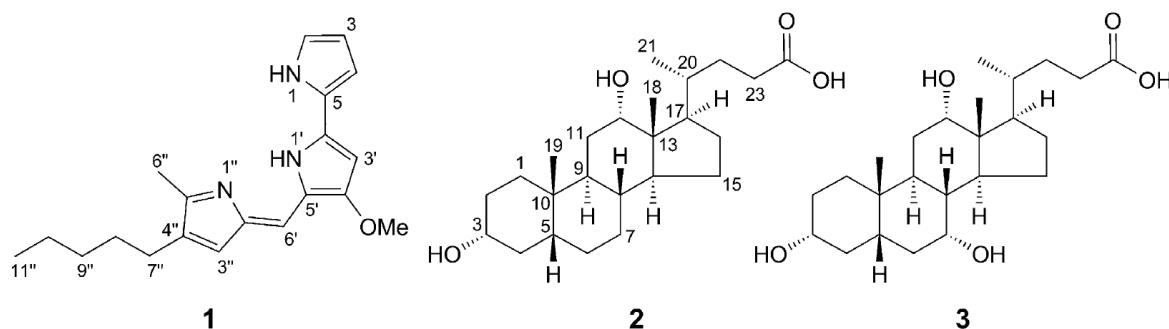


Fig. 3. Structures of compounds isolated from *Pseudoalteromonas sp.*

Table. Cytotoxicity of the *Pseudoalteromonas sp.* Crude Extract, Fraction (obtained by elution with hexane/AcOEt 3 : 2), and Prodigiosin on Tumor Cell Lines^a). Doxorubicin was used as positive control.

Sample	IC_{50} [$\mu\text{g/ml}$] CI 95%			
	HCT-8	HL-60	MDA-MB-435	SF-295
Crude extract	0.97	0.52	0.63	3.05
	0.77–1.22	0.36–0.75	0.54–0.74	1.92–4.85
Fr. 3	0.08	0.01	0.05	0.01
	0.07–0.09	0.01–0.02	0.03–0.09	0.00–0.04
Prodigiosin	0.05	0.06	0.19	0.06
	0.04–0.06	0.04–0.08	0.12–0.31	0.04–0.08
Doxorubicin	0.04	0.06	0.48	0.17
	0.03–0.05	0.04–0.09	0.35–0.65	0.13–0.23

^a) IC_{50} Values and their 95% confidence intervals were obtained by nonlinear regression using the GraphPad program (*Intuitive Software for Science*, San Diego, CA).

Chemical Studies on the Pseudoalteromonas sp. Extract. In addition to the isolation of prodigiosin as the active fraction of the *Pseudoalteromonas sp.* extract, the remaining fractions were studied. GC/MS Analysis of the fractions obtained by elution with hexane and hexane/AcOEt 4 : 1 led to the identification of the following fatty acids: (*Z*)-hexadec-9-enoic acid (t_R 23.61 min; 16.6%), (*E*)-hexadec-9-enoic acid (t_R 23.67 min; 12.9%), hexadecanoic acid (t_R 23.93 min; 29.3%), heptadec-9-enoic acid (t_R 24.93 min; 7.5%), heptadecanoic acid (t_R 25.22 min; 5.4%), octadec-9-enoic acid (t_R 26.18 min; 25.1%), and octadecanoic acid (t_R 26.4 min; 3.2%). Additionally, the known bile acids, deoxycholic acid **2** and cholic acid **3**, were isolated from fractions *Fr.* 6, obtained by elution with AcOEt, and *Fr.* 7 (128 mg), obtained by elution with AcOEt/MeOH 4 : 1 (Fig. 3).

Discussion. – This study demonstrates the isolation of prodigiosin produced by a *Pseudoalteromonas* strain associated with marine sediments from the northeastern coast of Brazil. The genus *Pseudoalteromonas* was formally described in [14] based on rRNA gene sequence data to accommodate eleven species previously described as *Alteromonas* species. According to [14], this genus includes *Gram*-negative, non-spore-forming, obligatory aerobic, marine bacteria with promising secondary metabolism and

high ecological significance, especially when considering the clades of pigmented species [14–16].

The species isolated in the present study matched all the characteristics described above and have a high similarity to *P. rubra* (ATCC 29570), which was first isolated by [17] from Mediterranean waters near Nice, France. The chemical study of the obtained AcOEt extract led to the isolation of prodigiosin as the active compound, and two common bile acids, deoxycholic acid and cholic acid [18][19].

Prodigiosin is a tripyrrole red pigment first isolated from *Serratia* species [20]. This pigment and its related compounds have been further isolated from different bacterial species, including *Pseudoalteromonas* spp. [21–25]. Although the literature on this class of compounds is vast, and knowledge on biosynthetic pathways is rapidly increasing, the physiological role of prodigiosin in its producers remains unclear [25]. Nonetheless, the biological activities described for prodigiosin account for most of the published research, and they include antibacterial, antimalarial, antitumor, and immunosuppressive properties [13][26][27]. In this context, prodigiosin is considered a promising molecule in cancer treatment, and, until now, four possible mechanisms for its anticancer activity have been considered: intracellular acidification, DNA damage, modulation of signal transduction pathways, and cell cycle arrest [13][27]. However, it seems that the mechanism may depend on the cell type, and molecular targets have not been conclusively identified. Our present findings corroborate previous data on the cytotoxicity of prodigiosin toward tumor cell lines with IC_{50} values in the nM range. In the NCI (National Cancer Institute) database, prodigiosin demonstrates an average IC_{50} value of 13.7 nM toward the 60-cell line panel, with an average LC_{50} value of 2.1 μ M (www.dtp.nci.nih.gov under NSC 47147-F).

Furthermore, prodigiosin was also assayed for cytotoxicity against cells transfected with ErbB-2 cDNA, and it selectively recognized cells with moderate and high over-expression of ErbB-2 receptors. The tyrosine kinase receptor ErbB-2 is already a validated target for cancer therapy, being over-expressed in 25–30% of all breast tumors and associated with a poor prognosis [28–30]. The mechanisms involved in the selective recognition of ErbB-2 overexpressing cells by prodigiosin are not known; however, there are evidences that tyrosine kinase receptors play an important role. JAK3, a tyrosine kinase associated with cytokine signaling, is considered the target for the immunosuppressive effects of prodigiosin, which may also contribute to its anticancer properties [27]. Further studies are in progress to better understand the effects of prodigiosin on ErbB-2 overexpressing cells and its potential for human breast cancer therapy.

This work was supported by the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq), *Financiadora de Estudos e Projetos* (FINEP), and the *International Foundation for Science* (IFS). We also acknowledge Dr. *Anamaria Camargo Aranha* (Instituto Ludwig de Pesquisa Sobre o Câncer, Brasil) for donating the transfected cell lines. The manuscript was edited linguistically by *American Journal Experts* (key # 5B9B-CF21-6071-7CA2-3C38).

Experimental Part

Sampling and Bacterial-Strain Isolations. Sediment samples were collected at Taiba beach (03°30'21.23'S; 038°53'40.16'W), which is located on the northeastern coast of Brazil. Collections were

carried out using aseptic techniques, the material was gathered and stored using sterile utensils. For the isolation of microorganisms from the sediment, samples were suspended in sterile seawater in a proportion of 1:5 (*m/v*). Samples were diluted in a serial manner from 10^{-1} to 10^{-5} . Aliquots of 0.1 ml of each dilution were plated on *Petri* dishes containing starch casein agar or marine agar. Purification of each strain was secured by sequentially restreaking onto new agar plates, followed by *Gram* staining and light microscopy to confirm purity. Pure strains were inoculated into liquid media for scaled-up growth. Cultures of each isolated strain were sampled into cryotubes and supplemented with 20% glycerol (*v/v*) for storage at -70° .

Scaled-up Growth and Extraction. First, pure cultures were inoculated into test tubes containing 10 ml of liquid media. Tubes were kept under a constant temp. and agitation for 96 h. Next, the grown cultures were diluted in *Erlenmeyer* flasks containing 250 ml of fresh media and agitated at 200 rpm (28°) for 5–7 d.

The resulting culture was filtered to separate the bacterial biomass from the spent medium, and the biomass was extracted with MeOH, while the medium was extracted overnight in AcOEt. The extracts were evaporated under a vacuum, washed with MeOH to remove excess salt, and fully dried under compressed air to yield the crude extracts. At this point, the extracts were ready to be evaluated for biological activity.

Extraction and Isolation of Pseudoalteromonas sp. Compounds. The AcOEt fraction (51) was dried (Na_2SO_4) and concentrated under reduced pressure to give 1.42 g of a crude pigment. The resulting material was fractionated by column chromatography (CC; silica gel; hexane, hexane/AcOEt 4:1, 3:2, 2:3, and 1:4, AcOEt, AcOEt/MeOH 4:1, 1:1, and MeOH) to afford 74 fractions of 8 ml each. After TLC, the fractions were grouped into eight main fractions, *Fr.* 1–8. The cytotoxic potential of each fraction was evaluated; however, only *Fr.* 3 (obtained by elution with hexane/AcOEt 3:2) was active. An aliquot of *Fr.* 3 (83.7 mg) was subjected to prep. silica-gel high-performance thin layer chromatography (HPTLC; *Merck*) and eluted with hexane/ CH_2Cl_2 /MeOH 5:4.5:0.5. The red pigment (33 mg) obtained was submitted to chromatography for a second time using this same procedure to afford 16.4 mg of a pure compound. On the basis of its NMR data, it was identified as *prodigiosin* (**1**) [31]. An aliquot of *Fr.* 1 (5 mg), obtained by elution with hexane and hexane/AcOEt 4:1, was subjected to an acid-catalyzed methanolysis with MeOH/HCl (5%). The methyl esters, after the usual workup, were analyzed by GC/MS. *Fr.* 6 (198 mg), obtained by elution with AcOEt, was subjected to CC (silica gel; increasing amounts of CH_2Cl_2 /AcOEt 9:1, 4:1, 7:3, 3:2, and 1:1, CH_2Cl_2 /MeOH 4:1, and MeOH). The CH_2Cl_2 /AcOEt 1:1 fraction (18.1 mg) was subjected to flash-CC (CH_2Cl_2 /MeOH 9.5:0.5) to yield a pure compound (14.8 mg) that was identified by means of HR-EI-MS and ^1H - and ^{13}C -NMR data as *deoxycholic acid* (**2**) [18]. *Fr.* 7 (128 mg), obtained by elution with AcOEt/MeOH 4:1, was repeatedly subjected to CC (*Sephadex LH-20*; MeOH) to afford a pure compound (13 mg) that was characterized by HR-EI-MS and ^1H - and ^{13}C -NMR data as *cholic acid* (**3**) [18]. The structures of these three compounds were elucidated based on HR-EI-MS, and ^1H - and ^{13}C -NMR data, which included 2D-NMR experiments, in addition to comparisons with published data.

Prodigiosin (= 4-Methoxy-5-[(*Z*)-(5-methyl-4-pentyl-2H-pyrrol-2-ylidene)methyl]-1H,1'H-2,2'-bipyrrole; **1**). Dark red solid. ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3): 12.7 (br. *s*, H-C(1')); 12.5 (br. *s*, H-C(1)); 7.23 (br. *s*, H-C(2)); 6.94 (*s*, H-C(6')); 6.92 (br. *s*, H-C(4)); 6.67 (*s*, H-C(3'')); 6.35 (br. *s*, H-C(3)); 6.07 (*s*, H-C(3')); 4.00 (*s*, MeO); 2.54 (br. *s*, Me(6'')); 2.39 (*t*, $J=10.0$, CH_2 (7'')); 1.57–1.53 (*m*, CH_2 (8'')); 1.32–1.31 (*m*, CH_2 (10'')); 1.29–1.26 (*m*, CH_2 (9'')); 0.90 (*t*, $J=6.5$, Me(11'')). ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3): 166.0 (C(4')); 147.9 (C(2')); 147.2 (C(5'')); 128.6 (C(3',4'')); 127.1 (C(2)); 125.4 (C(2'')); 122.4 (C(5)); 120.9 (C(5')); 117.2 (C(4)); 116.2 (C(6')); 111.9 (C(3)); 93.0 (C(3')); 58.9 (MeO); 31.6 (C(9'')); 30.0 (C(8'')); 25.5 (C(7'')); 22.7 (C(10'')); 14.2 (C(1'')); 12.6 (C(6'')). HR-ESI-MS: 324.2059 ($[M+H]^+$, $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}^+$; calc. 324.2075).

Deoxycholic Acid (= (3 α ,5 β ,12 α)-3,12-Dihydroxycholan-24-oic Acid; **2**). White solid. ^1H -NMR ((D_5)pyridine, 500 MHz): 4.21 (*s*, H-C(12)); 3.89–3.85 (*m*, H-C(3)); 2.69–2.64 (*m*, H-C(23a)); 2.56–2.50 (*m*, H-C(23b)); 2.32–2.27 (*m*, H-C(17)); 2.23–2.21 (*m*, H-C(9)); 2.21–2.19 (*m*, H-C(4a)); 2.16–2.14 (*m*, H-C(22a)); 1.99–1.96 (*m*, H-C(2a)); 1.95–1.93 (*m*, H-C(14)); 1.87–1.86 (*m*, CH_2 (16)); 1.85–1.84 (*m*, H-C(6a)); 1.83–1.81 (*m*, H-C(1a)); 1.78–1.76 (*m*, H-C(4b)); 1.75–1.72 (*m*, H-C(11a)); 1.65–1.58 (*m*, H-C(11b,15a)); 1.55–1.52 (*m*, H-C(20)); 1.46–1.41 (*m*, H-C(22b,8)); 1.40–1.38 (*m*,

H–C(5,2b,7a)); 1.24–1.23 (*m*, H–C(6b)); 1.22 (*d*, $J=6.2$, Me(21)); 1.16–1.11 (*m*, H–C(7b,15b)); 1.10–1.09 (*m*, H–C(1b)); 0.96 (*s*, Me(19)); 0.75 (*s*, Me(18)). ^{13}C -NMR ((D_5)pyridine, 125 MHz): 178.0 (C=O); 72.6 (C(12)); 71.6 (C(3)); 48.8 (C(14)); 47.3 (C(17)); 47.7 (C(13)); 42.9 (C(5)); 37.7 (C(4)); 36.8 (C(8)); 36.4 (C(20)); 35.9 (C(22)); 34.8 (C(10)); 34.3 (C(9)); 32.4 (C(23)); 31.7 (C(16)); 30.0 (C(11)); 28.4 (C(2)); 28.0 (C(6)); 27.0 (C(7)); 24.5 (C(15)); 23.9 (C(19)); 17.8 (C(21)); 13.4 (C(18)). HR-ESI-MS: 415.2901 ($[M+Na]^+$, $\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{O}_4^+$; calc. 415.2926).

Cholic Acid ($= (3\alpha,5\beta,7\alpha,12\alpha)\text{-}3,7,12\text{-Trihydroxycholestan-}24\text{-oic Acid}$; **3**). White solid. ^1H -NMR ((D_5)pyridine, 500 MHz): 4.25 (*s*, H–C(12)); 4.09 (*s*, H–C(7)); 3.78–3.73 (*m*, H–C(3)); 3.11 (*q*, $J=13.0$, H–C(8)); 2.92 (*dt*, $J=12.0, 4.2$, H–C(9)); 2.79–2.73 (*m*, H–C(14)); 2.67–2.61 (*m*, H–C(23a)); 2.56–2.50 (*m*, H–C(23b)); 2.39–2.34 (*m*, H–C(17)); 2.15–2.13 (*m*, $\text{CH}_2(22)$); 2.13–2.11 (*m*, H–C(4a)); 2.07–2.00 (*m*, H–C(15a)); 1.94–1.91 (*m*, H–C(1a,2a)); 1.88–1.86 (*m*, H–C(11a)); 1.68–1.67 (*m*, $\text{CH}_2(6)$); 1.67–1.62 (*m*, H–C(20,4b,2b,11b)); 1.51–1.49 (*m*, H–C(5)); 1.44–1.37 (*m*, $\text{CH}_2(16)$); 1.23 (*d*, $J=5.5$, Me(21)); 1.21–1.19 (*m*, H–C(15b)); 1.09–1.03 (*m*, H–C(1b)); 1.00 (*s*, Me(19)); 0.81 (*s*, Me(18)). ^{13}C -NMR ((D_5)pyridine, 125 MHz): 178.0 (C=O); 72.2 (C(3)); 72.7 (C(12)); 68.0 (C(7)); 47.6 (C(17)); 47.3 (C(13)); 43.0 (C(5)); 42.9 (C(14)); 41.4 (C(8)); 41.0 (C(4)); 36.6 (C(20)); 36.4 (C(1)); 36.2 (C(6)); 35.7 (C(10)); 32.4 (C(22)); 32.3 (C(23)); 32.0 (C(2)); 30.0 (C(11)); 28.5 (C(16)); 27.7 (C(9)); 24.2 (C(15)); 23.6 (C(19)); 17.9 (C(21)); 13.4 (C(18)). HR-ESI-MS: 431.2729 ($[M+Na]^+$, $\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{NaO}_5^+$; calc. 431.2773).

Molecular Identification: Nucleic Acid Extraction, 16S rRNA Gene Amplification, and Sequencing. Genomic DNA extraction from selected microorganisms was carried out using a CTAB (cetyl(trimethyl)ammonium bromide)-based protocol [32]. The concentration and quality of the DNA extractions were determined with a *Nanodrop* spectrophotometer *ND-1000* (*NanoDrop*, Wilmington, DE, USA).

The 16S rRNA gene was amplified from genomic DNA by PCR (polymerase chain reaction) using the primers 63F (5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3') and 1389R (5'-GGG CGG WGT GTA CAA GGC-3') [33]. Amplification reactions were performed in a final volume of 25 μl containing 100 ng of genomic DNA (template), 20 mM *Tris*·HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl_2 , 200 μM of each (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP), 0.5 μM of each primer and 1.0 units of Taq DNA Polymerase (*MBI Fermentas Inc.*, USA). PCRs were carried out in a thermocycler (*Eppendorf AG 22331*; Eppendorf, D-Hamburg) programmed for an initial denaturation step (4 min at 94°), followed by 35 cycles of 1 min 94°, 1 min at 55°, and 2 min at 72°. The last cycle was followed by a final extension of 10 min at 72°. The specificity of the amplifications was confirmed by 1.0% agarose gel electrophoresis stained with SYBR Safe DNA Gel Stain (*Invitrogen*, USA). PCR Products were purified using *Wizard SV Gel* and PCR Clean-up System (*Promega Corporation*, Madison, WI, USA).

DNA Sequencing was performed by *Macrogen Inc.* (Seoul, Korea) using the *ABI PRISM BigDye™* Terminator Cycle Sequencing kit (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA) following the protocols supplied by the manufacturer. The sequencing reactions were performed with the primers 63F, 1389R, 518F (5'-CCA GCA GCC GCG GTA ATA CG-3') and 800R (5'-TAC CAG GGT ATC TAA TCC-3'). The fluorescent-labeled fragments were purified according to an EtOH precipitation protocol, resuspended in dist. H_2O , and subjected to electrophoresis in an *ABI 3730* sequencer (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA).

The nucleotide sequences were assembled, analyzed, and manually edited using the Sequencher software package (Version 4.5; *Gene Codes Co.*, Ann Arbor, MI) and compared to sequences within the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). The obtained sequence was compared with all partial 16S rRNA gene sequences from *Pseudoalteromonas* type strains using the *EzTaxon* server 2.1 [34]. The nucleotide sequence was submitted to *NCBI GenBank* and is available under the accession No. HQ840708.

Phylogenetic Analysis. The identity of the strain was confirmed after an evaluation of the phylogenetic relationships with the most similar sequences obtained from the *EzTaxon* server. The sequences were aligned using Muscle ver. 3.6, and the reconstruction was performed using a combined bootstrapping and maximum likelihood approach through RAxML [35] on the CIPRES portal [36]. The tree was produced using TreeGraph 2.0 [37].

Anticancer Screening. Cytotoxic activity of the extracts and fractions was evaluated against four human tumor cell lines obtained from the National Cancer Institute (NSI; Bethesda, MD, USA): HL-60 (promyelocytic leukemia), MDA-MB-435 (melanoma), SF-295 (CNS glioblastoma), and HCT-8 (colon

carcinoma). Cells were grown in RPMI-1640 medium supplemented with 2 mM glutamine, 10% fetal calf serum, 100 µg/ml streptomycin, and 100 U/ml penicillin at 37° in a 5% CO₂ atmosphere. The cell cultures were regularly split to keep them in logarithmic growth phase.

The effect of 50 µg/ml concentrations of the extracts and 25 µg/ml fractions on tumor cell growth following 72 h of incubation was evaluated *in vitro* using the *Alamar* assay. Cells were plated in 96-well plates (2 × 10⁴ cells/well in 100 µl of medium). After 24 h, prodigiosin (0.01 to 25 µg/ml) dissolved in 1% DMSO was added to each well using the HTS (high-throughput screening), and cells were incubated for 72 h. Control groups received the same amount of DMSO. Twenty-four h before the end of the incubation, 10 µl of a stock soln. (0.436 mg/ml) of *Alamar Blue* (resazurin, *Sigma–Aldrich Co.*, St. Louis, MO, USA) was added to each well. Absorbance was measured with a multiplate reader (*DTX 880 Multimode Detector, Beckman Coulter, Inc.*, Fullerton, California, USA). The drug effect was quantified as the percentage of the control absorbance at 570 and 600 nm [38].

Extracts or fractions that caused more than 90% cell-growth inhibition were tested again at concentrations varying from 0.01 to 50 µg/ml to determine the 50% inhibitory concentration (*IC*₅₀), which was calculated by non-linear regression using the software GraphPad Prism 5.0.

Testing ErbB-2 Overexpressing Cells. To investigate the selectivity of prodigiosin toward ErbB-2 overexpressing cell lines, *Alamar Blue* assays were performed with two transfected cell lines, HB4a-C3.6 (moderate overexpression) and HB4a-C5.2 (high overexpression), which were obtained by transfecting an immortalized human breast luminal epithelial cell line HB4a with ErbB-2 cDNA [28] and the parental cell line HB4a [39]. These cells were kindly donated by Dr. *Anamaria Camargo Aranha* from the *Ludwig Institute* (São Paulo, Brazil). Cells were grown in RPMI-1640 medium supplemented with 2 mM glutamine, 10% fetal calf serum, 100 µg/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin, 1 µg/ml hydrocortisone, and 5 µg/ml insulin at 37° in a 5% CO₂ atmosphere. The assays were conducted essentially as previously described for the tumor cell lines.

REFERENCES

- [1] W. Fenical, P. R. Jensen, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, 2, 666.
- [2] W. Fenical, *Oceanography* **2006**, 19, 111.
- [3] P. R. Jensen, T. J. Mincer, P. G. Williams, W. Fenical, *Antoine van Leeuwenhoek* **2005**, 87, 43.
- [4] W. Fenical, P. R. Jensen, M. A. Palladino, K. S. Lam, G. K. Lloyd, B. C. Potts, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 175.
- [5] B. Nicholson, G. K. Lloyd, B. R. Miller, M. A. Palladino, Y. Kiso, Y. Hayashi, S. T. C. Neuteboom, *Anti-Cancer Drugs* **2006**, 17, 25.
- [6] T. F. Molinski, D. S. Dalisay, S. L. Lievens, J. P. Saludes, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2009**, 8, 69.
- [7] L. V. Costa-Lotufo, D. V. Wilke, P. C. Jimenez, R. de A. Epifanio, *Quim. Nova* **2009**, 32, 703.
- [8] B. Haefner, *Drug Discovery Today* **2003**, 8, 536.
- [9] D. J. Newman, G. M. Cragg, *Curr. Drug Targets* **2006**, 7, 279.
- [10] P. C. Jimenez, S. C. Fortier, T. M. C. Lotufo, C. Pessoa, M. E. A. Moraes, M. O. de Moraes, L. V. Costa-Lotufo, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **2003**, 287, 93.
- [11] E. G. Ferreira, D. V. Wilke, P. C. Jimenez, T. A. Portela, E. R. Silveira, E. Hajdu, C. Pessoa, M. O. Moraes, L. V. Costa-Lotufo, in 'Porifera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability', Ed. M. R. Custódio, G. Lôbo-Hajdu, E. Hajdu, G. Muricy, Museu Nacional, Rio de Janeiro, 2007, p. 313.
- [12] R. Pérez-Tomás, B. Montaner, E. Llagostera, V. Soto-Cerrato, *Biochem. Pharmacol.* **2003**, 66, 1447.
- [13] R. Pérez-Tomás, M. Viñas, *Curr. Med. Chem.* **2010**, 17, 2222.
- [14] G. Gauthier, M. Gauthier, R. Christen, *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1995**, 45, 755.
- [15] C. Holmström, S. Kjelleberg, *FEMS Microbiol. Ecol.* **1999**, 30, 285.
- [16] J. P. Bowman, *Mar. Drugs* **2007**, 5, 220.
- [17] M. J. Gauthier, *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1976**, 26, 459.
- [18] S. Maneerat, T. Nitoda, H. Kanzaki, F. Kawai, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, 67, 679.
- [19] H. Li, P. B. Shinde, H. J. Lee, E. S. Yoo, C.-O. Lee, J. Hong, S. H. Choi, J. H. Jung, *Arch. Pharm. Res.* **2009**, 32, 857.

- [20] H. H. Wasserman, J. E. McKeon, L. Smith, P. Forgione, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, 82, 506.
- [21] S. M. Lewis, W. A. Corpe, *Appl. Microbiol.* **1964**, 12, 13.
- [22] N. N. Gerber, M. J. Gauthier, *Appl. Environ. Microbiol.* **1979**, 37, 1176.
- [23] K. Kawauchi, K. Shibutani, H. Yagisawa, H. Kamata, S. Nakatsuji, H. Anzai, Y. Yokoyama, Y. Ikegami, Y. Moriyama, H. Hirata, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, 237, 543.
- [24] J. W. Bennet, R. Bentley, *Adv. Appl. Microbiol.* **2000**, 47, 1.
- [25] N. R. Williamson, P. C. Fineran, F. J. Leeper, G. P. C. Salmond, *Nat. Rev. Microbiol.* **2006**, 4, 877.
- [26] R. Pandey, R. Chander, K. B. Sainis, *Curr. Pharm. Des.* **2009**, 15, 732.
- [27] R. Pandey, R. Chander, K. B. Sainis, *Indian J. Biochem. Biophys.* **2007**, 44, 302.
- [28] R. A. Harris, T. J. Eichholtz, I. D. Hiles, M. J. Page, M. J. O'Hare, *Int. J. Cancer* **1999**, 80, 477.
- [29] J. W. Park, R. M. Neve, J. Szollosi, C. C. Benz, *Clin. Breast Cancer* **2008**, 8, 392.
- [30] M. Z. Ladjemi, W. Jacot, T. Chardès, A. Pèlegriin, I. Navarro-Teulon, *Cancer Immunol. Immunother.* **2010**, 59, 1295.
- [31] M.-J. Song, J. Bae, D.-S. Lee, C.-H. Kim, J.-S. Kim, S.-W. Kim, S.-I. Hong, *J. Biosci. Bioeng.* **2006**, 101, 157.
- [32] S. J. Warner, in 'Plant Gene Isolation: Principles and Practice', Eds. G. D. Foster, D. Twell, John Wiley & Sons, West Sussex, 1996, p. 51.
- [33] J. R. Marchesi, T. Sato, A. J. Weightman, T. A. Martin, J. C. Fry, S. J. Hiom, W. G. Wade, *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, 64, 795.
- [34] J. Chun, J.-H. Lee, Y. Jung, M. Kim, S. Kim, B. K. Kim, Y.-W. Lim, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2007**, 57, 2259.
- [35] A. Stamatakis, *Bioinformatics* **2006**, 22, 2688.
- [36] M. A. Miller, M. T. Holder, R. Vos, P. E. Midford, T. Liebowitz, L. Chan, P. Hoover, T. Warnow, The CIPRES Portals, CIPRES, URL: http://www.phylo.org/sub_sections/portal, accessed: 2010-12-20 (Archived by WebCite(r) at <http://www.webcitation.org/5imQlJeQa>).
- [37] B. C. Stöver, K. F. Müller, *BMC Bioinformatics* **2010**, 11, 7.
- [38] S. A. Ahmed, R. M. Gogal Jr., J. E. Walsh, *J. Immunol. Methods* **1994**, 170, 211.
- [39] A. C. Stamps, S. C. Davies, J. Burman, M. J. O'hare, *Int. J. Cancer* **1994**, 57, 1.

Received March 18, 2011

Anthracyclinones from *Micromonospora* sp.

Thician da S. Sousa,[†] Paula C. Jimenez,[‡] Elthon G. Ferreira,[‡] Edilberto R. Silveira,[†] Raimundo Braz-Filho,^{†,§} Otilia D. L. Pessoa,^{*,†} and Letícia V. Costa-Lotufo^{*,‡,§}

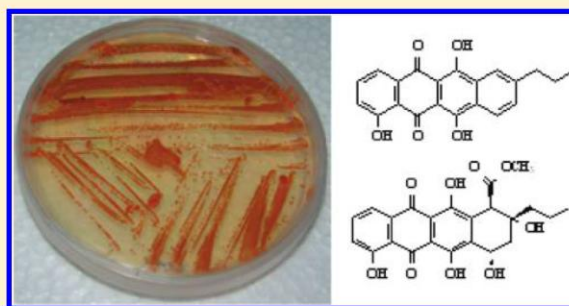
[†]Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 60.021-970, Brazil

[‡]Instituto de Ciências do Mar, LABOMAR, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 60.165-081, Brazil

[§]Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 60.430-270, Brazil

Supporting Information

ABSTRACT: Four new anthracyclinones, 4,6,11-trihydroxy-9-propyltetracene-5,12-dione (1), 1-methoxy-9-propyltetracene-6,11-dione (2), 7,8,9,10-tetrahydro-9-hydroxy-1-methoxy-9-propyltetracene-6,11-dione (3), and 10 β -carbomethoxy-7,8,9,10-tetrahydro-4,6,7 α ,9 α ,11-pentahydroxy-9-propyltetracene-5,12-dione (4), were isolated from a strain of *Micromonospora* sp. associated with the tunicate *Eudistoma vannamei*. All structures were established by 1D and 2D NMR (COSY, HSQC, HMBC, NOESY) and HRESIMS experiments. Compounds 1 and 4 were cytotoxic against the HCT-8 human colon adenocarcinoma cell line, with IC₅₀ values of 12.7 and 6.2 μ M, respectively, while compounds 2 and 3 were inactive.



The chemistry and pharmacology of marine microorganisms has been extensively investigated in the last five years with unprecedented results. The bacteria, particularly those from the order Actinomycetales, commonly known as actinomycetes have proven to be a prolific source of new and bioactive compounds.¹ The secondary metabolites produced by actinomycetes display a broad spectrum of biological activities including antibacterial, antifungal, antiprotozoal, anthelmintic, antiviral, insecticidal, cytotoxic, antioxidant, and anti-inflammatory.² Among the various genera within the actinomycetales, *Micromonospora* has been intensively investigated, leading to the isolation of several active secondary metabolites, such as anthraquinones,³ anthracyclines,⁴ alkaloids,⁵ and macrolides.⁶

As part of our efforts to obtain anticancer secondary metabolites from marine natural sources, we have investigated the extract of a *Micromonospora* sp. strain isolated from *Eudistoma vannamei*, a Brazilian endemic ascidian. *E. vannamei* is largely found along the coast of northeastern Brazil, especially the rocky beaches of Ceará State.⁷ The apoptosis-inducing activity found in extracts of *E. vannamei* were previously reported, while the chemical nature of these compounds remained unknown.^{7,8} Herein, we describe the isolation and structure elucidation of four new anthracyclinones (1–4). The cytotoxicity of these compounds was evaluated using the MTT assay against HCT-8 human adenocarcinoma cancer cells. The active EtOAc extract of *Micromonospora* sp. was fractionated using chromatographic methods (open silica gel column, Sephadex LH-20 and HPLC) to afford four anthracyclinones (1–4), Figure 1.

Compound 1 was isolated as a red powder. Its molecular formula, C₂₁H₁₆O₅, was deduced by HRESIMS spectrum from

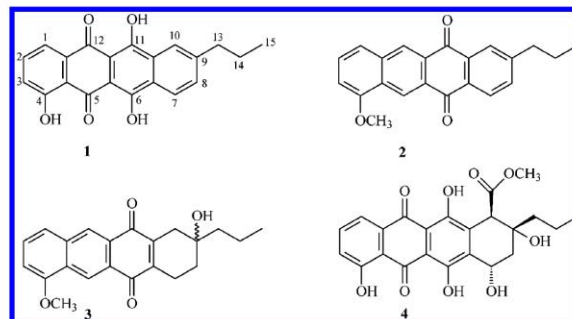


Figure 1. Structures of compounds 1–4 isolated from *Micromonospora* sp.

the quasimolecular ion peak $[M + H]^+$. The IR spectrum displayed absorption bands at 3368, 1675, 1601, and 1589 cm^{-1} for a hydroxyl, conjugated ketone, and aromatic ring, respectively. The ¹H NMR spectrum of 1 displayed signals for three chelated hydroxyl groups at δ 15.44 (s), 14.32 (s), and 12.47 (s) and aromatic protons at δ 8.40 (d, $J = 8.3$ Hz, H-7), 8.29 (s, H-10), and 7.64 (dd, $J = 8.3, 1.4$ Hz, H-8) corresponding to an AMX system. Also in the aromatic region were observed signals at δ 7.95 (H-1), 7.71 (H-2), and 7.28 (H-3). In addition, the ¹H NMR spectrum of 1 displayed signals for a propyl moiety (Table 1). The ¹³C NMR and DEPT spectra of 1 exhibited 21

Special Issue: Special Issue in Honor of Gordon M. Cragg

Received: September 30, 2011

Published: January 17, 2012

Table 1. ^1H (500 MHz) and ^{13}C (125 MHz) NMR Data of Compounds 1–4^a

position	1		2		3		4	
	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)
1	118.9	7.95, dd (8.1, 0.8)	122.1	7.65, d (7.6)	122.9	7.65, d (8.0)	119.9	7.85, d (8.0)
2	136.3	7.71, t (8.1)	130.1	7.60, t (7.6)	131.0	7.56, t (8.0)	137.6	7.70, t (8.0)
3	123.5	7.28, dd (8.1, 0.8)	107.3	6.99, d (7.6)VN	108.4	6.96, d (8.0)	125.0	7.30, d (8.0)
4	162.6		157.4		157.9		162.9	
4a	119.2		127.7		127.8		116.2	
5	185.5		124.6	9.27, s	123.6	9.30, s	191.1	
5a	106.5		129.3		129.4		111.7	
6	160.4		182.9		184.9		156.1	
6a	128.1		132.9		147.2		135.2	
7	125.4	8.40, d, (8.3)	127.9	8.32, d (8.0)	22.6	3.12, m 3.01, br d (18.7)	62.8	5.32, t (3.0)
8	132.8	7.64, dd (8.3, 1.7)	134.7	7.58, d (8.0)	33.2	2.03, m 1.65, m	35.2	2.29, d (3.0)
9	147.6		150.0		69.2		71.6	
10	124.5	8.29, s	127.3	8.19, br s	37.2	3.24, d (19.1) 2.78, d (19.1)	51.9	4.27, s
10a	131.0		134.6		145.4		137.4	
11	161.9		183.7		185.5		157.2	
11a	117.3		130.6		132.2		111.5	
12	183.6		129.0	8.77, s	128.6	8.96, s	186.3	
12a	134.4		136.4		136.8		133.6	
13	38.4	2.84, t (7.5)	38.4	2.79, t (7.5)	46.3	1.70, m	42.6	1.68, td (12.5, 3.7) 1.49, td (12.5, 4.0)
14	24.3	1.79, m	24.3	1.75, sext (7.5)	17.6	1.67, m	15.9	1.78, m 1.59, m
15	14.1	1.01, t (7.3)	13.9	1.00, t (7.5)	15.7	0.95, t (6.8)	14.8	1.00, t (7.2)
16							171.5	3.73, s
17							52.6	
4-OCH ₃			56.0	4.07, s	56.5	3.84, s		
4-OH		12.47, s						12.05, s
6-OH		14.32, s						13.41, s
11-OH		15.44, s						12.87, s

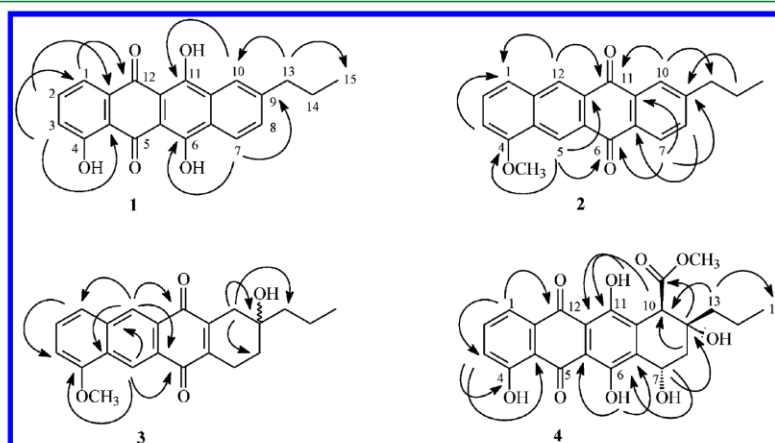
^aCDCl₃ (1, 2, and 4); C₃D₃N (3).

Figure 2. Important HMBC correlations for compounds 1–4.

carbon signals comprising one methyl, two methylenes, six sp^2 methines, and 12 non-hydrogen-bearing carbons, including two carbonyl (δ 183.6 and 188.5) and three oxygenated (δ 162.6, 160.4, and 161.9) carbons. The spectroscopic data are compatible with a trihydroxy-anthracyclonone bearing a propyl group. The isopropyl moiety at C-9 was determined by HMBC

correlations from H-10 (δ 8.29) to C-11 (δ 161.9) and C-13 (δ 38.4) and from H-8 (δ 7.64) to C-13. The key correlations from H-7 (δ 8.40) to C-6 (δ 160.4) and C-9 (δ 147.6), as well as from H-1 (δ 7.95) to C-12 (δ 183.6), were critical in determining the complete structure of 1 (Figure 2), which was established as 4,6,11-trihydroxy-9-propyltetracene-5,12-dione.

Compound **2** was obtained as an orange powder. Its molecular formula, $C_{22}H_{18}O_3$, was deduced by HRESIMS spectrum from the quasimolecular ion peak $[M + H]^+$. Its IR spectrum displayed an intense absorption band at 1675 for a conjugated ketone, as well as skeletal bands at 1617 and 1589 cm^{-1} . The 1H NMR spectrum of **2** displayed two deshielded singlets at δ 9.27 (H-5) and 8.77 (H-12) for protons *peri* to the carbonyls, signals for two AMX systems, one at δ 7.60 (H-2), 6.99 (H-3), and 7.65 (H-1) and a second at δ 8.32 (H-7), 7.58 (H-8), and 8.19 (H-10). Additionally, the 1H NMR spectrum showed signals for a methoxyl and a propyl group (Table 1). The ^{13}C NMR and DEPT spectra of **2** displayed 22 carbon signals comprising two methyls (one of them a methoxyl), two methylenes, eight sp^2 methines, and 10 non-hydrogen-bearing carbons, including two carbonyls (δ 183.7 and 182.9). These data showed that **2** is also an anthracyclinone derivative, however with a different arrangement of carbonyl carbons than **1**. The observed long-range correlations of H-10 (δ 8.19) with C-11 (δ 183.7) and C-13 (δ 38.4), of H-7 (δ 8.32) with C-6 (δ 182.9) and C-9 (δ 150.0), and of H-14 (δ 1.75) with C-9 indicated the position of the isopropyl group at C-9, as well as the carbonyl groups at C-6 and C-11 (C ring) (Figure 2). On the basis of these data, the structure of **2** was established as 4-methoxy-9-propyltetracene-6,11-dione.

Compound **3** was isolated as a yellow powder. Its molecular formula, $C_{22}H_{22}O_4$, was determined by HRESIMS spectrum. The IR spectrum exhibited absorption bands at 3400, 1660, and 1615 cm^{-1} for hydroxyl, conjugated ketone, and carbon-carbon double bonds, respectively. The 1H NMR spectrum of **3** exhibited two isolated signals at δ 9.30 (s) and 8.96 (s) in the aromatic region, as well as signals at δ 7.65 (H-1), 7.56 (H-2), and 6.96 (H-3). Additionally, the 1H NMR spectrum showed signals for a methyl group and eight methylene protons (Table 1). The ^{13}C NMR and DEPT spectra of **3** exhibited 22 carbon signals comprising one methyl, one methoxyl, five methylenes, five sp^2 methines, and 10 non-hydrogen-bearing carbons, including two carbonyls (δ 185.5 and 184.9) and one oxygenated sp^3 (δ 69.2) carbon. The spectroscopic data were compatible with a methoxylated anthracyclinone derivative bearing a propyl group. The HMBC experiment showed correlations of the protons at δ 9.30 (H-5) and 8.96 (H-12) with the carbonyls at δ 184.9 (C-6) and 185.5 (C-11), respectively, and for the diastereotopic methylene protons at δ 3.24/2.78 (2H-10) with the carbons at δ 69.2 (C-9), 33.2 (C-8), and 46.3 (C-13). Other important HMBC correlations are depicted in Figure 2. On the basis of the data, the structure of compound **3** was established as the new 7,8,9,10-tetrahydro-9-hydroxy-4-methoxy-9-propyltetracene-6,11-dione. It was not possible to unambiguously determine the stereochemistry of the single stereocenter of **3**, but on the basis of models from literature the α -positioning of the hydroxyl at C-9 was suggested.⁹

Compound **4** was also isolated as a yellow powder. Its molecular formula, $C_{23}H_{22}O_8$, was deduced by HRESIMS. Its IR spectrum showed an absorption band at 3400 cm^{-1} corresponding to a hydroxyl group and bands at 1729 and 1606 cm^{-1} corresponding to an ester and conjugated ketone, respectively. The 1H NMR spectrum of **4** exhibited signals at δ 7.85 (H-1), 7.70 (H-2), and 7.30 (H-3), which were shown to be vicinal by coupling constants. In addition, the 1H NMR spectrum exhibited signals for an oxymethine proton at δ 5.32 (H-7) and a benzylic methine α -positioned to a carboxyl at δ 4.27 (H-10), along with signals for a methoxyl and a propyl moiety (Table 1). The ^{13}C NMR and DEPT spectra of **4**

exhibited 23 carbon signals, revealing a similar structure to compounds **1–3**, with additional signals for a carbomethoxy moiety and an additional sp^3 oxymethine carbon. The HMBC experiment showed correlation of the signal at δ 7.85 (H-1) with the carbonyl carbon at δ 186.3 (C-12). A hydroxyl group was placed at C-7 with correlations of the oxymethine proton at δ 5.32 (H-7) with the carbons at δ 156.1 (C-6), 137.4 (C-10a), and 71.6 (C-9). The carbomethoxy group was located at C-10 through correlations of the signal at δ 4.27 (H-10) with the carbons at δ 157.2 (C-11), 42.5 (C-13) and the carboxyl carbon at δ 171.5 (C-16) (Figure 2). The relative stereochemistry of the stereocenters of **4** (D ring) was deduced by the NOESY experiment, coupling constant values, and comparison with literature data for similar compounds.^{4,10} The NOE correlations of H-10 (δ 4.27) with H-13a (δ 1.68) and H-14a (δ 1.78) suggested that both carbomethoxy and propyl groups were β -positioned. The configuration of C-7 was determined on the basis of the multiplicities and coupling constant values displayed for H-7 and the homotopic methylene protons 2H-8. On the basis of the data above it was inferred that the D ring adopts a skew-type conformation, in which the oxymethine proton H-7 is β in order to hold the same dihedral angles (about 60°), and justifying the small *J* value and the multiplicity of H-7 (t) and 2H-8 (d). The structure of **4** was established as 10 β -carbomethoxy-7,8,9,10-tetrahydro-4,6,7 α ,9 α ,11-pentahydroxy-9-propyltetracene-5,12-dione, an analogue of ϵ -rhodomycinone, whose difference is the presence of a propyl group instead of an ethyl group at C-9.¹⁰

Anthracyclines comprise a group of aromatic glycosidic microbial polyketides common in Actinomycetes, typically from *Streptomyces* spp.,¹¹ but also from the genus *Micromonospora*.^{3,4,12–14} They are a diverse group of molecules, which differ in the number and position of hydroxyl or methoxyl groups in the anthraquinone nuclei, in the substitution pattern and stereochemistry of the D ring, and in the complexity of the glycoside moieties.¹¹ The anthracyclines are among the most studied natural products due to their importance in cancer therapeutics.^{11,15} The molecular mechanism of action of anthracyclines includes DNA damage mediated by topoisomerase II or by reactive oxygen species.¹⁵ The aglycones of the anthracyclines, named anthracyclinones, common in Actinomycetes,⁹ have been also isolated from the genus *Micromonospora*.¹⁶

The cytotoxic activity of compounds **1–4** was evaluated against HCT-8 human adenocarcinoma cells (Table 2).

Table 2. Cytotoxicity of Compounds 1–4 on HCT-8 Cells, Evaluated by the MTT Assay after 72h Exposure^a

	1	2	3	4	doxorubicin
IC ₅₀	12.7	>70	>70	6.2	0.1
95% CI	9.9–19.1			5.0–7.6	0.06–0.13

^a IC₅₀ (μ M) values and 95% CI were obtained by nonlinear regression using the GraphPad program (Intuitive Software for Science, San Diego, CA, USA).

Interestingly, the 5,12-anthracyclinones **1** and **4** displayed moderate cytotoxicity, with IC₅₀ values of 12.7 and 6.2 μ M, respectively, while 6,11-anthracyclinones derivatives **2** and **3** were considered inactive. In general the anthracyclines are 80- to 100-fold more active than their respective aglycones.^{17,18} Indeed the anthracycline doxorubicin, used as positive control, was 141 and 69 times more active than **1** and **4**, respectively. The synthesis and isolation of new enantiomerically pure

anthracyclonone moieties is a key strategy for developing new anthracyclines with improved therapeutic efficacy and reduced cardiotoxicity.¹⁹ Further studies are in progress to obtain the anthracyclines from the isolated anthracyclonones and also to characterize their mechanism of cytotoxic action.

EXPERIMENTAL SECTION

General Experimental Procedures. Melting points (mp) were measured on a Marconi N480D apparatus. Optical rotations were measured on a Perkin-Elmer 341 digital polarimeter. IR spectra were obtained on a Perkin-Elmer FT-IR spectrum 1000 spectrometer. High-resolution electrospray ionization mass spectra (HRESIMS) were acquired using a LCMS-IT-TOF (Shimadzu) spectrometer. ¹H (500 MHz) and ¹³C (125 MHz) NMR spectra were performed on a Bruker DRX-500 spectrometer. HPLC analysis was carried out using a UFLC (Shimadzu) system equipped with a SPD-M20A diode array UV-vis detector and a Phenomenex C₁₈ column, 5 μm (4.6 × 250 mm). Column chromatography was carried out on silica gel 60 (70–230 mesh, Vetec or 230–400 mesh, Merck), Sephadex LH-20, or SPE C₁₈ cartridges (Strata C18-E, 20 g/60 mL, 55 μm, 70 Å) from Phenomenex. TLC was performed on precoated silica gel aluminum sheets (Kieselgel 60 F₂₅₄, 0.20 mm, Merck), and compounds were visualized by heating (~100 °C) the plates sprayed with a vanillin/perchloric acid/EtOH solution.

Microorganism. *Eudistoma vannamei*, an endemic tunicate from the northeastern coast of Brazil, was manually collected at Taíba Beach, Ceará (03°30'21.23" S; 038°53'40.16" W) and sprayed with 70% EtOH for superficial decontamination. The sample was washed in autoclaved seawater and kept frozen at –20 °C for 4 weeks. The sample was processed further under sterile conditions: crushed colonies of the tunicate were spread on various agar-media plates and left at 28 °C. Four weeks later, an orange-brown spore-forming colony was separated from GYM media (malt extract, glucose, and yeast extract from Difco). This strain was identified as *Micromonospora* sp. based on 16S rRNA gene sequencing and BLAST analysis. The nucleotide sequence was submitted to NCBI GenBank and is available under the accession number JN797618. *Micromonospora* sp. was then grown in 36 replicates of 2.0 L Erlenmeyer flasks containing 500 mL of A1 broth (10 g of starch, 2 g of peptone, and 4 g of yeast extract from Difco in 1 L of seawater 75%) under 200 rpm agitation during 10 days at room temperature and then extracted with EtOAc.

Extraction and Isolation. The EtOAc extract (18 L) was dried over Na₂SO₄ and concentrated over reduced pressure to give 1.6 g of the crude extract. This material was fractionated over silica gel by elution with *n*-hexane, 1:1 *n*-hexane/CH₂Cl₂, CH₂Cl₂, 1:1 CH₂Cl₂/EtOAc, EtOAc, 1:1 EtOAc/MeOH, and MeOH to yield seven fractions (F-1 to F-7). F-2 (143.3 mg) was subjected to a silica gel column using a gradient of *n*-hexane/CH₂Cl₂ (8:2, 7:3, 1:1), CH₂Cl₂, and MeOH to yield 43 fractions of approximately 8 mL each. Compound 1 (4 mg) was isolated from F-17/20, obtained by elution with *n*-hexane/CH₂Cl₂ (7:3). F-26/30 (48.6 mg, obtained by elution with *n*-hexane/CH₂Cl₂, 1:1) was applied to HPLC analysis using a RP-C₁₈ column (250 mm × 10 mm i.d. × 5 μm) in the isocratic mode using 95:5 methanol/water as eluent (v/v) and a flow rate of 4.5 mL min⁻¹ with an injection volume ("loop") of 200 μL to yield compound 2 (5.9 mg). Compound 3 (6.5 mg) was isolated from F-3 (160.4 mg) by HPLC using a RP-C₁₈ column (250 × 10 mm i.d. × 5 μm) in the isocratic mode, with acetonitrile/water, 8:2 (v/v), and a flow rate of 4.7 mL min⁻¹ with an injection volume ("loop") of 200 μL. F-4 (203 mg) was subjected to silica gel flash column chromatography using an isocratic system of *n*-hexane/EtOAc (9:1) to provide 23 fractions of approximately 3 mL each. Compound 4 (2.1 mg) was isolated from F-16/20.

1,6,11-Trihydroxy-9-propyltetracene-5,12-dione (1): red resin; IR (KBr) ν_{\max} 3400, 2919, 2853, 1594, 1453, 1383, 1219, 1028, 772 cm⁻¹; ¹H (500 MHz, CDCl₃) and ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) data, see Tables 1 and 2; positive HRESIMS *m/z* 349.1063 (calcd) [M + H]⁺ (calcd for C₂₁H₁₆O₅, 349.1076).

1-Methoxy-9-propyltetracene-6,11-dione (2): orange powder; mp 192.3–192.7 °C; IR (KBr) ν_{\max} 3368, 2956, 2922, 1675, 1601, 1294, 1271, 970, 772, 748 cm⁻¹; ¹H (500 MHz, CDCl₃) and ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) data, see Tables 1 and 2; positive HRESIMS *m/z* 331.1345 (calcd) [M + H]⁺ (calcd for C₂₂H₁₈O₃, 331.1334).

7,8,9,10-Tetrahydro-9-hydroxy-1-methoxy-9-propyltetracene-6,11-dione (3): yellow resin; [α]_D²⁰ –65 (c 0.02, CHCl₃); IR (KBr) ν_{\max} 3400, 2952, 2921, 2849, 1660, 1615, 1385, 1290, 1068, 770, 746 cm⁻¹; ¹H (500 MHz, Py-*d*₃) and ¹³C NMR (125 MHz, Py-*d*₃) data, see Tables 1 and 2; positive HRESIMS *m/z* 351.1575 (calcd) [M + H]⁺ (calcd for C₂₂H₂₂O₄, 351.1596).

10β-Carbomethoxy-7,8,9,10-tetrahydro-4,6,7α,9α,11-pentahydroxy-9-propyltetracene-5,12-dione (4): yellow powder; mp 173.5–173.8 °C; [α]_D²⁵ –61.5 (c 0.013, CHCl₃); IR (KBr) ν_{\max} 3400, 2952, 2922, 2849, 1739, 1729, 1606, 1460, 1277, 1022, 771 cm⁻¹; ¹H (500 MHz, CDCl₃) and ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) data, see Tables 1 and 2; negative HRESIMS *m/z* 441.1170 (calcd) [M – H][–] (calcd for C₂₃H₂₂O₉, 441.1185).

Cytotoxicity Evaluation: MTT Assay. Cytotoxic activity was evaluated against the HCT-8 human cancer adenocarcinoma cell line obtained from Children's Mercy Hospital, Kansas City, MO, USA. Cells were grown in RPMI-1640 medium supplemented with 2 mM glutamine, 10% fetal calf serum, 100 μg/mL streptomycin, and 100 U/mL penicillin and housed at 37 °C with a 5% CO₂ atmosphere. The cell cultures were regularly split to keep them in a logarithmic phase of growth.

The compounds were tested at concentrations ranging from 0.01 to 25 μg/mL during 72 h, and the effect on cell proliferation was evaluated *in vitro* using the MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide] assay, as described by Mosmann.²⁰ IC₅₀ (the concentration that inhibits growth by 50%) values were calculated, along with the respective 95% CI (confidence interval), by nonlinear regression using the software GraphPad Prism 5.0.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

IR, HRESIMS, and ¹H and ¹³C NMR spectra of compounds 1–4 are available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*(O.D.L.P.) Tel: +55-85-33669441. Fax: +55-85-33669782. E-mail: opessoa@ufc.br. (L.V.C.-L.) Tel: + 55-85-33668255. Fax: +55-85-33668333. E-mail: costalotufog@gmail.com.

Notes

[#]Pesquisador Emérito Visitante, FAPERJ/UENF/UFRRJ.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the National Agencies CNPq, FUNCAP, CAPES, and PRONEX for financial support.

DEDICATION

Dedicated to Dr. Gordon M. Cragg, formerly Chief, Natural Products Branch, National Cancer Institute, Frederick, Maryland, for his pioneering work on the development of natural product anticancer agents.

REFERENCES

- Jensen, P. R.; Mincer, T. J.; Williams, P. G.; Fenical, W. *Antonie van Leeuwenhoek* **2005**, *87*, 43–48.
- Kekuda, T. R. P.; Shobha, K. S.; Onkarappa, R. *J. Pharm. Res.* **2010**, *3*, 250–256.
- Igarashi, Y.; Yanase, S.; Sugimoto, K.; Enomoto, M.; Miyanaga, S.; Trujillo, M. E.; Saiki, I.; Kuwahara, S. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 862–865.

- (4) Yang, S.-W.; Chan, T.-M.; Terracciano, R. P.; Loeberberg, D.; Chen, G.; Patel, M.; Gullo, V.; Pramanik, B.; Chu, M. *J. Antibiot.* **2004**, *57*, 601–604.
- (5) Charan, R. D.; Schlingmann, G.; Janso, J.; Bernan, V.; Feng, X.; Carter, G. T. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1431–1433.
- (6) Gaertner, A.; Ohlendorf, B.; Schulz, D.; Zinecker, H.; Wiese, J.; Imhoff, J. F. K. *Mar. Drugs* **2011**, *9*, 98–108.
- (7) Jimenez, P. C.; Fortier, S. C.; Lotufo, T. M. C.; Pessoa, C.; Moraes, M. E. A.; Moraes, M. O.; Costa-Lotufo, L. V. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **2003**, *287*, 93–101.
- (8) Jimenez, P. C.; Wilke, D. V.; Takeara, R.; Lotufo, T. M. C.; Pessoa, C.; Moraes, M. O.; Lopes, N. P.; Costa-Lotufo, L. V. *Comp. Biochem. Physiol.* **2008**, *151*, 391–398.
- (9) Clark, B.; Capon, R. J.; Stewart, M.; Lacey, E.; Tennant, S.; Gill, J. *H. J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1729–1731.
- (10) Johdo, O.; Ishikura, T.; Takeuchi, A. *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 1110–1120.
- (11) Laatsch, H.; Fotso, S. *Top. Curr. Chem.* **2008**, *282*, 3–74.
- (12) Igarashi, Y.; Trujillo, M. E.; Martínez-Molina, E.; Yanase, S.; Miyanaga, S.; Obata, T.; Sakurai, H.; Saiki, I.; Fujita, T.; Furumai, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 3702–3705.
- (13) He, H.; Ding, W. D.; Bernan, V. S.; Richardson, A. D.; Ireland, C. M.; Greenstein, M.; Ellestad, G. A.; Carter, G. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5362–5363.
- (14) Nair, M. G.; Mishra, S. K.; Putnam, A. R.; Pandey, R. C. *J. Antibiot.* **1992**, *45*, 1738–1745.
- (15) Beretta, G. L.; Zunino, F. *Top. Curr. Chem.* **2008**, *283*, 1–19.
- (16) Ströck, K.; Zeeck, A.; Antal, N.; Fiedler, H.-P. *J. Antibiot.* **2005**, *58*, 103–110.
- (17) Dessypris, E. N.; Brenner, D. E.; Hande, K. R. *Cancer Treat. Rep.* **1986**, *70*, 487–490.
- (18) Dessypris, E. N.; Brenner, D. E.; Baer, M. R.; Hande, K. R. *Cancer Res.* **1988**, *48*, 503–506.
- (19) Acmatowicz, O.; Szechner, B. *Top. Curr. Chem.* **2008**, *282*, 143–186.
- (20) Mosmann, T. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63.

Research Article

Cytotoxicity of actinomycetes associated with the ascidian *Eudistoma vannamei* (Millar, 1977), endemic of northeastern coast of Brazil

**Paula C. Jimenez^{1,2}, Elthon G. Ferreira^{1,2}, Luana A. Araújo¹, Larissa A. Guimarães¹, Thiciana S. So
Otilia Deusdenia L. Pessoa³, Tito M. C. Lotufo¹ & Leticia V. Costa-Lotufo^{1,2}**

¹Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR), Universidade Federal do Ceará
Av. Abolição, 3207, 60165-081, Fortaleza, Brazil

²Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina
Universidade Federal do Ceará, Av. da Universidade, 2853 Benfica
Fortaleza, CE, 60020-181, Brazil

³Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará
Av. da Universidade, 2853, Benfica, Fortaleza, CE, 60020-181, Brazil

ABSTRACT. Previous studies demonstrated that the crude extract of the ascidian *Eudistoma vannamei*, endemic from northeastern Brazil, strongly hinders growth of tumor cells *in vitro* by inducing apoptosis due to tryptophan derivatives, which are commonly found in bacteria. This study presents a bioactivity-guided screening among actinomycetes, associated with *E. vannamei*, aiming at recognizing active principles with biological relevance. Twenty strains of actinomycetes, designated as EVA 0101 through 0120, were isolated from colonies of *E. vannamei* among which 11 were selected for cytotoxicity evaluation. The extracts from EVA 0102, 0103, 0106, 0109 and 0113 were the most active, and were further studied for IC₅₀ determination and chemical analysis by ¹H NMR. IC₅₀ values obtained ranged from 3.62 µg mL⁻¹ (for EVA 0109 in leukemia cells) to 84.65 µg/mL (for EVA 0106 in melanoma cells). All active extracts exhibited the same TLC and spectroscopic profiles, suggesting the presence of quinones and other related secondary metabolites. Furthermore, these strains were identified and compared based on their respective 16S rRNA sequences. The results herein identified the five strains as *Micromonospora* spp. while phylogenetic analysis suggests that they are possibly two different *Micromonospora* species producing the cytotoxic compounds.

Keywords: marine biotechnology, *Eudistoma vannamei*, marine microorganisms, *Micromonospora* sp., Brazil.

Citotoxicidad de actinomicetos asociada a la ascidia *Eudistoma vannamei* (Millar, 1977), endémica de la costa noreste de Brasil

RESUMEN. Estudios previos demostraron que el extracto crudo de la ascidia *Eudistoma vannamei*, endémica de la costa noreste de Brasil, obstaculiza fuertemente el crecimiento de células tumorales *in vitro* por inducir apoptosis. El análisis químico del extracto sugirió la presencia de derivados de triptófano, comúnmente encontrados en bacterias. El estudio presenta un screening de citotoxicidad en actinomicetos asociados con *E. vannamei*, para reconocer principios activos biológicamente relevantes. Veinte cepas de actinomicetos, designados como EVA 0101 hasta 0120, fueron aisladas de colonias de *E. vannamei* y 11 fueron seleccionadas para la evaluación de citotoxicidad. Los extractos de EVA 0102, 0103, 0106, 0109 y 0113 resultaron las más activas y fueron estudiadas para determinación de la CL₅₀ y perfiles de CCF y ¹H RMN. Las CL₅₀ obtenidas oscilaron entre 3,62 (EVA 0109 en las células de leucemia) y 84,65 µg mL⁻¹ (EVA 0106 en las células de melanoma). Los extractos activos presentan el mismo perfil de CCF y espectroscópico, lo que sugiere la presencia de quinonas y metabolitos secundarios relacionados. Además, las cinco cepas fueron identificadas y comparadas sobre la base de sus secuencias de 16S ARNr. Las que se identificaron como *Micromonospora* spp. y el análisis filogenético sugiere que sean por lo menos dos especies de *Micromonospora* las que producen los compuestos citotóxicos.

Palabras clave: biotecnología marina, *Eudistoma vannamei*, microorganismos marinos, *Micromonospora* sp., Brasil.

Corresponding author: Leticia Lotufo (lvcosta@secrel.com.br)

INTRODUCTION

Colorful soft-bodied sessile marine invertebrates have been a rich source of natural products with biomedical properties for the past 60 years (Baily, 2009; Molinski *et al.*, 2009; Mayer *et al.*, 2010). Among them, the tunicates are one of the most prolific in terms of novel drug prototypes for the anticancer pharmaceutical arsenal (Blunt *et al.*, 2010, 2011). For instance, trabectedin, a tetrahydroisoquinoline alkaloid obtained from *Ecteinascidia turbinata*, was recently approved for the treatment of soft tissue sarcoma, with the commercial name Yondelis[®] (Cuevas & Francesh, 2009; D'Incalci & Galmarini, 2010). Additionally, plitidepsin, a cyclodepsipeptide isolated from *Aplidium albicans* is in advanced trial phase for the therapy of multiple myeloma and other malignant tumors, but has already received orphan drug status for the treatment of multiple myeloma and acute lymphoblastic leukemia (Ocio *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2008).

There are mounting evidences that the associated microorganisms are the authentic suppliers for most of the relevant compounds (Zhang *et al.*, 2005; Imhoff *et al.*, 2011). For the ascidians, in particular, there is a compelling amount of information pointing into this direction (Schmidt & Donia, 2010). Despite the oceans are acknowledged as a rich and highly complex microbiological environment, they have only shared their wealth as a natural drug source for the past 10 years. Thus, the study of marine microorganisms as sources of new drugs is still at its youth (Jensen *et al.*, 2005; Fenical & Jensen, 2006; Liu *et al.*, 2010).

This study takes part in a pioneer venture aiming to the exploration of the biotechnological potentials of microorganisms, mainly actinomycetes, from the coast of Ceará. The actinomycetes have proven to be a prolific source of new and bioactive compounds (Fenical & Jensen, 2006). The purpose of the present investigation is to find biologically active strains of actinomycetes and evaluate their respective cytotoxicity, while gathering information on the microbiota associated with *Eudistoma vannamei*. This species is endemic from the northeastern coast of Brazil and is the most abundant ascidian recorded for the state of Ceará. Previous studies have revealed that its crude extract strongly hinders growth of tumor cells *in vitro*,

promoting further apoptosis (Jimenez *et al.*, 2003, 2008).

MATERIALS AND METHODS

Sampling and isolation of bacteria strains

Specimens of *E. vannamei* were hand collected at Taiba Beach (03°30'21.23"S, 038°53'40.16"W), located on the northeastern coast of Brazil. Sampling was carried out with the slightest contamination possible, as the material was gathered and stored with sterile utensils. For isolation of microorganisms, five colonies were homogenized in sterile seawater 1:5 (m/v), and aliquots of 20 L were stroked onto Petri dishes containing different agar based media, which may favor actinomycetes growth (modified from Jensen *et al.*, 1991). The following agar-based media were used herein, all added with cycloheximide 0.1 mg mL⁻¹: SCA (Starch Casein Agar, HIMEDIA, prepared with distilled H₂O), AIA (Actinomycetes Isolation Agar, HIMEDIA, prepared in 75% seawater), SWA (Sea-water Agar, 1.8% agar in 75% seawater) and GYM (glucose 0.4%, yeast extract 0.4%, malt extract 1%, CaCO₃ 0.2%, 1.8% agar in 75% seawater).

Purity of strains were resolved by sequential restrikes onto brand new agar plates and pure strains were inoculated in liquid A1 medium (10% soluble starch, 4% yeast extract and 2% peptone in 75% seawater) for culture maintenance and up-scaled growth (Jensen *et al.*, 1991). Grown media for each pure strain was sampled into cryovials and supplemented with 25% glycerol for storage at -70°C.

Up-scaled growth and extraction

Initially, pure cultures were inoculated in 500 mL Erlenmeyer flasks filled with 100 mL of liquid A1 medium. Flasks were kept at 28°C and 200 rpm for 5 days. Next, 10 mL of grown media were added to newly assembled Erlenmeyer flasks with 100 mL of fresh media and kept at 28°C and 200 rpm agitation for 10 days.

The resulting media was spun down to separate the bacterial biomass from the broth. Biomass was extracted with MeOH 1:1 (m/v) while broth was extracted in EtOAc 1:1 (v/v). The crude extracts were evaporated under vacuum, washed with MeOH to

remove excessive salt, and fully dried under compressed air, yielding the crude extracts. At this point, extracts were resuspended in DMSO to a final concentration of $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ and were ready to be evaluated for their biological activity.

Screening for cytotoxicity-MTT assay

Cytotoxic activity of extracts was evaluated against four human tumor cell lines obtained from the National Cancer Institute (Bethesda, MD, USA): HL-60 (promyelocytic leukemia), MDA-MB-435 (melanoma), SF-295 (glioblastoma) and HCT-8 (colon carcinoma). Cells were grown in RPMI-1640 medium supplemented with 2 mM glutamine, 10% fetal calf serum, $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ streptomycin and 100 U mL^{-1} penicillin and housed at 37°C with a 5% CO_2 atmosphere. The cell cultures were regularly split to keep them in a logarithmic phase of growth.

Firstly, in a qualitative approach, cell lines were exposed to $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ of the extracts for 72 h and the effect on cell proliferation was evaluated *in vitro* using the MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide] assay, as described by Mosmann (1983). The extracts that reduced over 80% of cell growth, when compared to non-treated cells, were tested again, in a quantitative manner, however, at concentrations varying serially from 0.02 to $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ to determine the IC_{50} (the concentration that inhibits growth in 50%), which was calculated, along with the respective 95% CI (confidence interval), by a non-linear regression using the software GraphPad Prism 5.0.

Preliminary chemical analysis

The active extracts (EVA 0102, EVA 0106, EVA 0109 and EVA 0113) were submitted to a preliminary chemical characterization. Initially, these extracts were compared by thin layer chromatography (TLC) on precoated silica gel aluminum sheets (Kieselgel 60 F₂₅₄, 0.20 mm, Merck) using two different solvent systems (CHCl_3 and CHCl_3 : EtOAc 1:1) and the compounds were detected by exposure to UV (312 and 365 nm) light and by spraying with vanillin/perchloric acid/EtOH solution followed by heating at 100°C . The extracts were also analyzed by ^1H NMR spectroscopy. The ^1H NMR spectra were acquired on a Bruker Avance DRX-500 spectrometer equipped with 5 mm inverse detection z-gradient probe. The chemical shifts, given on the δ scale, were referenced to the residual undeuterated CHCl_3 (δ_{H} 7.27) fraction. The methodology was based in a previous work published by Jimenez *et al.* (2008).

Molecular identification: nucleic acid extraction, 16S rRNA gene amplification, and sequencing

The selected microorganisms were characterized using a molecular approach based on the protocol described by Gontang *et al.* (2007) with slight modifications. Genomic DNA was extracted from a fresh, 3 to 5 day grown, bacterial culture following the DNeasy protocol (QIAGEN Inc., USA). Amplification of the 16S rRNA gene was carried out with Illustra™ PureTaq Ready-To-Go PCR beads (GE Healthcare, UK) using the universal eubacterial primers 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'). PCR products were purified with MiniElute PCR purification kit (QIAGEN Inc., USA).

DNA sequencing was performed by Macrogen Inc. (Seoul, Korea) using the ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, USA) and the same primers used for amplification, following the protocols supplied by the manufacturer.

The nucleotide sequences were assembled, analyzed and manually edited using the BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999) and compared to sequences within the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

The identity of the strain was confirmed after an evaluation of the phylogenetic relationships with the most similar sequences obtained from the EzTaxon server (Chun *et al.*, 2007). The sequences were aligned using Muscle ver. 3.6, and the reconstruction was performed using a combined bootstrapping and maximum likelihood approach through RAxML (Stamakis, 2006) on the CIPRES portal (Miller *et al.*, 2010). The tree was produced using Archaeopteryx ver. 0.957 (Han & Zmasek, 2009). After the phylogenetic analysis, the sequences were submitted to NCBI GenBank.

RESULTS

Isolation and cytotoxicity screening of bacteria associated with *E. vancouverensis*

Twenty colonies were isolated from *E. vancouverensis* respecting their actinomycete-like distinctiveness. Out of those, 11 were elected for cytotoxicity evaluation on tumor cells. In the single concentration screening, extracts obtained from strains EVA 0102, EVA 0103, EVA 0106, EVA 0109 and EVA 0113 were the most active, reducing proliferation of HCT-8 and SF-295 cells in over 75% (Fig. 1).

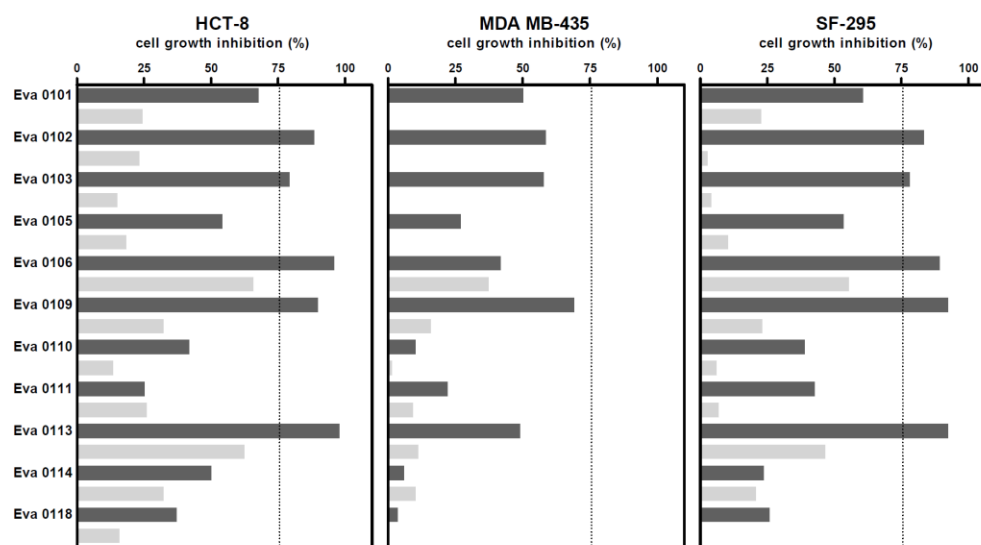


Figure 1. Qualitative cytotoxicity screening of EtOAc extracts from liquid medium (dark gray) and MeOH extracts from biomass (light gray) of bacterial strains isolated from *E. vannamei*. Extracts were tested ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) against HCT-8, MDA-MB-435 and SF-295 cell lines by the MTT assay after 72 h incubation. Data were obtained from two independent experiments and presented as a percentage of growth inhibition relative to untreated cells.

Table 1. Cytotoxic activity of EtOAc extracts obtained from bacterial strains isolated from *Eudistoma vannamei* evaluated by the MTT assay after 72 h incubation. IC_{50} values and their respective 95% confidence intervals were obtained by nonlinear regression on the GraphPad Prism 5.0 software (Intuitive Software for Science, San Diego, CA). N.T.: not tested.

Strain	Isolation media	IC_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			
		95% CI			
		HL-60	HCT-8	MDA MB-435	SF-295
EVA 0102	SCA	24.05 14.81 - 39.06	16.48 13.22 - 20.55	60.41 49.20 - 74.17	26.87 17.77 - 40.65
EVA 0106	AIA	61.92 32.85 - 116.7	14.66 7.831 - 27.44	84.65 64.17 - 111.7	14.06 8.243 - 23.96
EVA 0109	GYM	3.88 2.43 - 6.20	3.62 0.44 - 0.67	23.78 19.86 - 28.48	5.12 4.43 - 5.91
EVA 0113	SWA	30.07 17.71 - 51.06	10.90 6.83 - 17.38	N.T.	9.97 6.92 - 14.38

The IC_{50} was determined for the extracts obtained from EVA 0102, EVA 0106, EVA 0109 and EVA 0113, since the yield of the extract from EVA 0103 was insufficient for further analyses. The tested extracts showed a similar activity profile, with little variation in potency. As shown on Table 1, EVA 0109 yielded the most cytotoxic extract, with IC_{50} values varying from 3.62 to 23.78 $\mu\text{g mL}^{-1}$. EVA 0113

followed, with IC_{50} ranging from 9.97 to 30.07 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Chemical analysis of active extracts

The extracts from EVA 0102, EVA 0106, EVA 0109 and EVA 0113 were similar on TLC and, as expected, showed the same spectroscopic profile by ^1H NMR. For this reason, just one ^1H NMR spectrum was

depicted (Fig. 2). After a detailed analysis, it was clear the presence of chelated hydroxyl groups (δ 15.44-12.29), aromatic and/or olefine hydrogens (δ 8.41-5.92), hydrogens bound to oxygenated carbon (δ 3.64-3.54), as well as methylene, methyne and methyl protons (δ 2.34-0.83) (Silverstein *et al.*, 1991).

The aforementioned data were compatible with the presence of quinones or related secondary metabolites.

Identification and phylogenetic analyses

The analysis of the 16S rRNA from the 5 EVA bacterial strains revealed a high degree of similarity among them (Fig. 3). When included in a reconstruction of the phylogeny along with the most similar sequences found on Genbank, the EVA clade came out as the sister group of a clade formed by *Micromonospora echinospora*, *M. marina*, *M. aurantiaca*, *M. halophytica*, *M. humi*, *M. purpureochromogenes*, *M. coxensis*, *M. chalcea* and *M.*

tulbaghiae. The EVA clade was formed with a relatively high support value and EVA 0109, 0113, 0102 and 0106 showed a higher degree of overall similarity. For this clade a single contig was then generated and deposited on NCBI GenBank under accession number JN797618. The sequence from EVA 0103 is slightly different, so it was deposited with a separate accession number (JN797619), despite its 16S rRNA sequence is still more than 99.9% similar to the other EVA strains.

DISCUSSION

The study herein began with a screening for cytotoxicity among actinomycetes isolated from the tunicate *E. vannamei*. The active extracts showed identical ^1H NMR profiles and the respective strains were identified based on a molecular biology approach, where all five isolates were identified within the genus *Micromonospora*. The results pointed

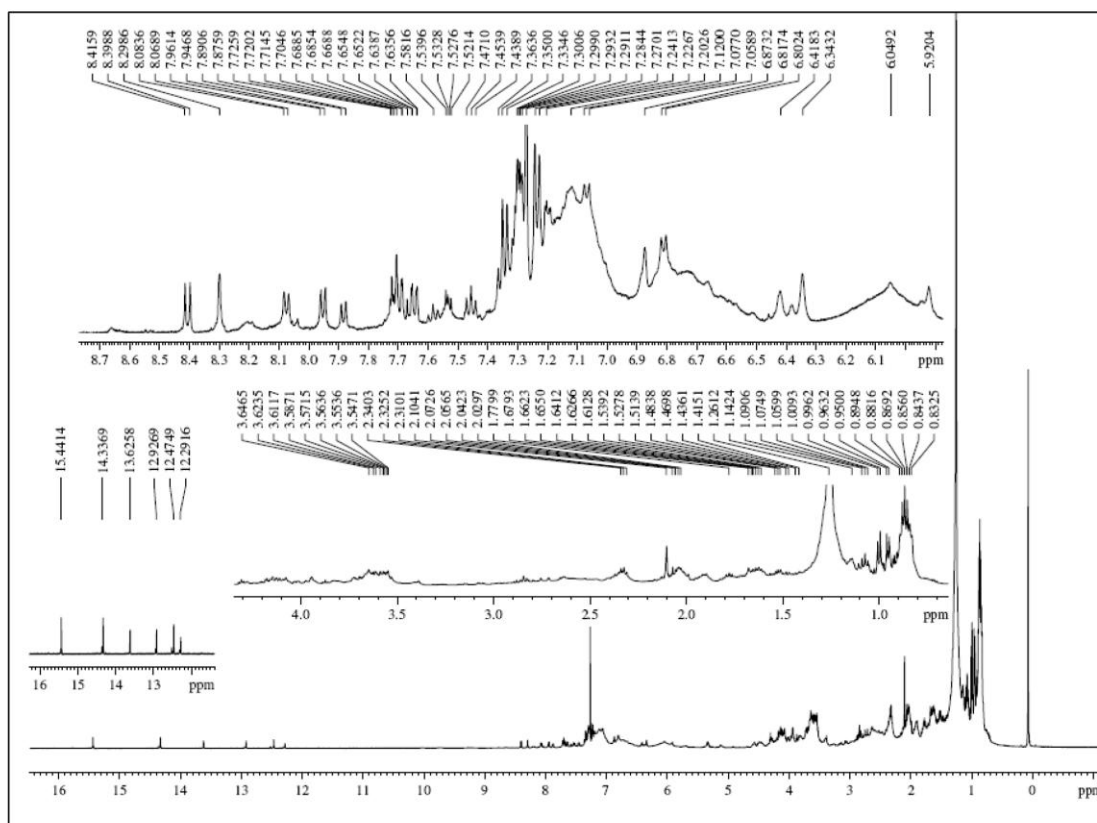


Figure 2. ^1H NMR spectrum (500 MHz, CDCl_3) of the EtOAc extract from EVA 0102.

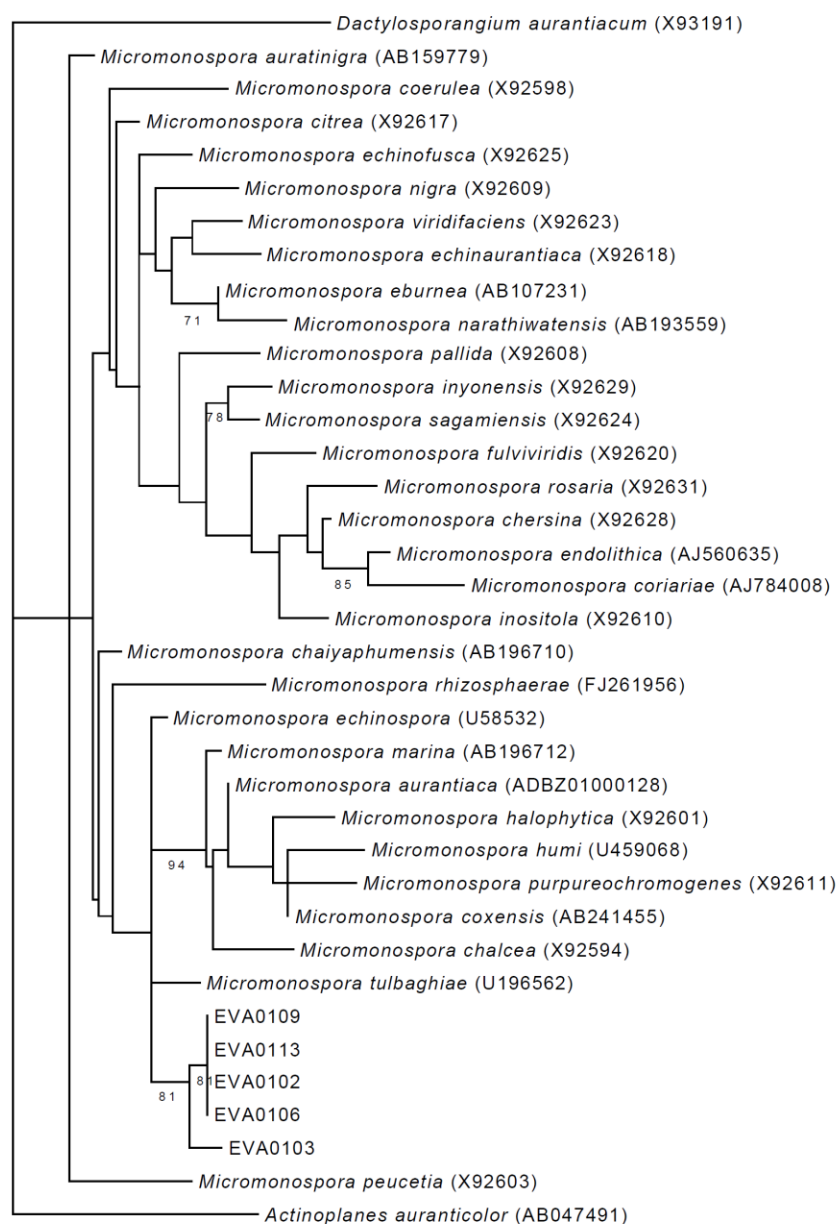


Figure 3. Maximum likelihood tree of the *Micromonospora* lineages isolated from *E. vannamei* and most similar species. *Dactylosporangium* and *Actinoplanes* were used as outgroups.

to at least two species of *Micromonospora* producing cytotoxic compounds associated with *E. vannamei*. *Micromonospora* are a well-known group of Gram-positive, spore forming microbes, and are considered the most abundant actinobacteria, along with *Rhodococcus* and *Streptomyces* in marine environments (Maldonado *et al.*, 2005). Additionally, they are

long accepted as an important source of antibiotics and other substances with commercial value. For instance, some of the best-known antibiotics, such as the aminoglycosides amikacin, gentamicin and netamicin, were initially isolated from these microorganisms (Bérdy, 2005). Furthermore, *Micromonospora* species with marine occurrence have

yielded many compounds with biomedical relevance. Thiocoraline is produced by a strain of *M. marina* isolated from a soft coral collected near the coast of Mozambique (Romero *et al.*, 1997). This cyclic thiodipeptide showed strong cytotoxic activity against various tumor cell lines, with IC₅₀ around 2nM. Moreover, thiocoraline induced cell cycle perturbations due to inhibition of DNA-polymerase activity (Pérez-Baz *et al.*, 1997; Romero *et al.*, 1997; Erba *et al.*, 1999). Other example is diazepinomicin, a dibenzodiazepine alkaloid with antimicrobial properties isolated from a *Micromonospora* strain recovered from *Didemnum proliferum*, a tunicate collected off the Japanese coast (Charan *et al.*, 2004).

In fact, associations of *Micromonospora* and other actinomycetes with tunicates have been documented elsewhere (Menezes *et al.*, 2010). The Fijian tunicate *Polysyncraton lithostrotum* is the host to the then unidentified species *M. lomaivitiensis*, the producer of the potent anticancer compounds lomaivitins A and B (He *et al.*, 2001). These molecules also have antimicrobial activity, which is thought to scare off other bacteria (He *et al.*, 2001).

The results presented here, showing the cytotoxicity of a *Micromonospora* strain and describing its association with the Brazilian endemic ascidian *E. vancouverensis*, highlight their potential as producers of relevant molecules. The chemical profile of *Micromonospora* extracts was different from the one observed by Jimenez *et al.* (2008) for *E. vancouverensis* extracts. While the active compounds presented in ascidian extracts correspond to tryptophan derivatives, spectra data generated for the bacterial extracts herein hinted on the presence of quinoid-like compounds, such as anthracyclines or anthracyclonones (Pretsch *et al.*, 2000; Laatsch & Fotso, 2008). This data suggested that the isolated *Micromonospora* strain is not responsible for the production of ascidian bioactive compounds. Nonetheless, the activity was similar for both ascidian extract (IC₅₀ ranging from below 2.00 to 23.80 µg mL⁻¹, Jimenez *et al.*, 2008) and bacterial ones (IC₅₀ ranging from 3.62 to 84.65 µg mL⁻¹).

The occurrence of anthracyclines or related compounds withholding some sort of bioactivity is rather common within the *Micromonospora* genus. *M. lupini* yielded the anti-cell invasion anthraquinones lupinacidins A, B and C (Igarashi *et al.*, 2007, 2011). The anthracyclines micromonocin (Yang *et al.*, 2004) and spartamicins A and B (Nair *et al.*, 1992), produced by different strains of *Micromonospora*, have antimicrobial and antifungal properties, respectively. Moreover, the previously mentioned lomaivitins are hybrid molecules flanked with naphthoquinone moieties (He *et al.*, 2001).

Finally, it can be concluded that actinomycetes isolated from the Brazilian endemic ascidian *E. vancouverensis* are a promising source of bioactive compounds. Therefore, additional studies are in progress to resolve the active principles and to characterize the means by which they may exert cytotoxicity.

ACKNOWLEDGMENTS

This work has been supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) and International Foundation for Science (IFS). The authors also wish to thank Silvana França, for technical assistance with the cell cultures, and M.Sc. José Gustavo de A. Lima for generating and editing the ¹H NMR spectra.

REFERENCES

- Baily, C. 2009. Ready for a comeback of natural products in oncology. *Biochem. Pharmacol.*, 77(9): 1447-1457.
- Bérdy, J. 2005. Bioactive microbial metabolites: a personal view. *J. Antibiot.*, 58: 1-26.
- Blunt, J.W., B.R. Copp, W.P. Hu, M.H. Munro, P.T. Northcote & M.R. Prinsep. 2010. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 27: 165-237.
- Blunt, J.W., B.R. Copp, W.P. Hu, M.H. Munro, P.T. Northcote & M.R. Prinsep. 2011. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 28: 196-268.
- Charan, R.D., G. Schlingmann, J. Janso, V. Bernan, X. Feng, & G.T. Carter. 2004. Diazepinomicin, a new antimicrobial alkaloid from a marine *Micromonospora* sp. *J. Nat. Prod.*, 67(8): 1431-1433.
- Chun, J., J.H. Lee, Y. Jung, M. Kim, S. Kim, B.K. Kim & Y.W. Lim. 2007. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57: 2259-2261.
- Cuevas, C. & A. Francesch. 2009. Development of Yondelis (trabectedin, ET-743). A semisynthetic process solves the supply problem. *Nat. Prod. Rep.*, 26(3): 322-337.
- D'Incalci, M. & C.M. Galmarini. 2010. A review of trabectedin (ET-743): a unique mechanism of action. *Mol. Cancer Ther.*, 9(8): 2157-2163.
- Erba, E., D. Bergamaschi, S. Ronzoni, M. Faretta, S. Taverna, M. Bonfanti, C.V. Catapano, G. Faircloth, J. Jimeno & M. D'Incalci. 1999. Mode of action of thiocoraline, a natural marine compound with antitumor activity. *Braz. J. Cancer*, 80: 971-980.

- Fenical, W. & P.R. Jensen. 2006. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nature Chem. Biol.*, 2: 666-673.
- Gontang, E.A., W. Fenical & P.R. Jensen. 2007. Phylogenetic diversity of gram-positive bacteria cultured from marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(10): 3272-3282.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp.*, 41: 95-98.
- Han, M.V. & C.M. Zmasek. 2009. PhyloXML: XML for evolutionary biology and comparative genomics. *BMC Bioinformatics*, 10: 356.
- He, H., W.D. Ding., V.S. Bernan, A.D. Richardson, C.M. Ireland, M. Greenstein, G.A. Ellestad & G.T. Carter. 2001. Lomaiviticins A and B, potent antitumor antibiotics from *Micromonospora lomaivitiensis*. *J. Am. Chem. Soc.*, 123: 5362-5363.
- Igarashi, Y., M.E. Trujillo, E. Martínez-Molina, S. Yanase, S. Miyanaga, T. Obata, H. Sakurai, I. Saiki, T. Fujita & T. Furumai. 2007. Antitumor anthraquinones from an endophytic actinomycete *Micromonospora lupini* sp. nov. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 17(13): 3702-3705.
- Igarashi, Y., S. Yanase, K. Sugimoto, M. Enomoto, S. Miyanaga, M.E. Trujillo, I. Saiki & S. Kuwahara. 2011. Lupinacidin C, an inhibitor of tumor cell invasion from *Micromonospora lupini*. *J. Nat. Prod.*, 74(4): 862-865.
- Imhoff, J.F., A. Labes & J. Wiese. 2011. Bio-mining the microbial treasures of the ocean: new natural products. *Biotechnol. Adv.*, 29(5): 468-482.
- Jensen, P.R., R. Dwight & W. Fenical. 1991. Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57(4): 1102-1108.
- Jensen, P.R., T.J. Mincer, P.G. Williams & W. Fenical. 2005. Marine actinomycetes diversity and natural product discovery. *Antonie van Leeuwenhoek*, 87(1): 43-48.
- Jimenez, P.C., S.C. Fortier, T.M.C. Lotufo, C. Pessoa, M.E.A. Moraes, M.O. Moraes & L.V. Costa-Lotufo. 2003. Biological activity in extracts of ascidians (Tunicata, Ascidiacea) from the northeastern Brazilian coast. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 287(1): 93-101.
- Jimenez, P.C., D.V. Wilke, R. Takeara, T.M. Lotufo, C. Pessoa, M.O. Moraes, N.P. Lopes & L.V. Costa-Lotufo. 2008. Cytotoxic activity of a dichloromethane extract and fractions obtained from *Eudistoma vannamei* (Tunicata: Ascidiacea). *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.*, 151(3): 391-398.
- Laatsch, H. & S. Fotso. 2008. Naturally occurring anthracyclines. *Top. Curr. Chem.*, 282: 3-74.
- Liu, X., E. Ashforth, B. Ren, F. Song, H. Dai, M. Liu, J. Wang, Q. Xie & L. Zhang. 2010. Bioprospecting microbial natural product libraries from the marine environment for drug discovery. *J. Antibiot.*, 63: 415-422.
- Maldonado, L.A., J.E. Stach, W. Pathomaree, A.C. Ward, A.T. Bull & M. Goodfellow. 2005. Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. *Antonie van Leeuwenhoek*, 87(1): 11-18.
- Mayer, A.M.S., K.B. Glaser, C. Cuevas, R.S. Jacobs, W. Kem, R.D. Little, J.M. McIntosh, D.J. Newman, B.C. Potts & D.E. Shuster. 2010. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. *Trends Pharmacol. Sci.*, 31(6): 255-265.
- Menezes, C.B.A., R.C. Bonugli-Santos, P.B. Miqueletto, M.R.Z. Passarini, C.H.D. Silva, M.R. Justo, R.R. Leal, F. Fantinatti-Garboggini, V.W. Oliveira, R.G. Berlinck & L.D. Sette. 2010. Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo State, Brazil. *Microbiol. Res.*, 165(6): 466-482.
- Miller, M.A., M.T. Holder, R. Vos, P.E. Midford, T. Liebowitz, L. Chan, P. Hoover & T. Warnow. 2010. The CIPRES Portals. CIPRES. 2010-12-20. URL: http://www.phylo.org/-sub_sections/portal. Reviewed: 20 December 2010. (Archived by WebCite(r) at <http://www.web-citation.org/5imQIJeQa>).
- Molinski, T.F., D.S. Dalisay, S.L. Lievens & J.P. Saludes. 2009. Drug development from marine natural products. *Nat. Rev. Drug Disc.*, 8(1): 69-85.
- Mosmann, T.J. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65: 55-63.
- Nair, M.G., S.K. Mishra, A.R. Putnam & R.C. Pandey. 1992. Antifungal anthracycline antibiotics, spartanamicins A and B from *Micromonospora* spp. *J. Antibiot.*, 45(11): 1738-1745.
- Ocio, E.M., M.V. Mateos, P. Maiso, A. Pandiella & J.F. San-Miguel. 2008. New drugs in multiple myeloma: mechanisms of action and phase I/II clinical findings. *Lancet Oncol.*, 9(12): 1157-1165.
- Pérez-Baz, J., L.M. Cañedo, P.J.L. Fernández & M.V. Silva-Elipse. 1997. Thiocoraline, a novel depsipeptide with antitumor activity produced by a marine *Micromonospora*. II. Physicochemical properties and structure determination. *J. Antibiot.*, 50(9): 738-741.

- Pretsch, E., P. Bühlmann & C. Affolter. 2000. Structure determination of organic compounds. Tables of spectral data. Springer-Verlag, New York, 436 pp.
- Romero, F., F. Espliego, J. Pérez-Baz, T. García de Quesada, D. Grávalos, F. de la Calle & J.L. Fernández-Puentes. 1997. Thiocoraline, a new depsipeptide with antitumor activity produced by a marine *Micromonospora*. I. Taxonomy, fermentation, isolation, and biological activities. *J. Antibiot.*, 50(9): 734-737.
- Schmidt, E.W. & M.S. Donia. 2010. Life in cellulose houses: symbiotic bacterial biosynthesis of ascidian drugs and drug leads. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 21: 827-833.
- Singh, R., M. Sharma, P. Joshi & D.S. Rawat. 2008. Clinical status of anti-cancer agents derived from marine sources. *Anticancer Agents Med. Chem.*, 8(6): 603-617.
- Silverstein, R.M., G.C. Bassler & T.C. Morrill. 1991. Spectrometric identification of organic compounds. John Wiley & Sons, New York, pp. 289-314.
- Stamakis, A. 2006. RAXML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22(21): 2688-2690.
- Yang, S.W., T.M. Chan, J. Terracciano, R. Patel, D. Loebenberg, G. Chen, M. Patel, V. Gullo, B. Pramanik & M. Chu. 2004. A new anthracycline antibiotic micromonocin from *Micromonospora* sp. *J. Antibiot.*, 57(9): 601-604.
- Zhang, L., R. An, J. Wang, N. Sun, S. Zhang, J. Hu & J. Kuai. 2005. Exploring novel bioactive compounds from marine microbes. *Curr. Opin. Microbiol.*, 8(3): 276-281.

Received: 16 May 2011; Accepted: 22 October 2012

Article

Kocurin, the True Structure of PM181104, an Anti-Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Thiazolyl Peptide from the Marine-Derived Bacterium *Kocuria palustris*

Jesús Martín¹, Thiciana da S. Sousa¹, Gloria Crespo¹, Sara Palomo¹, Ignacio González¹, José R. Tormo¹, Mercedes de la Cruz¹, Matthew Anderson^{2,†}, Russell T. Hill², Francisca Vicente¹, Olga Genilloud¹ and Fernando Reyes^{1,*}

¹ Fundación MEDINA, Centro de Excelencia en Investigación de Medicamentos Innovadores en Andalucía, Avda. del Conocimiento 3, Granada 18016, Spain;

E-Mails: jesus.martin@medinaandalucia.es (J.M.); thicy85@yahoo.com.br (T.S.S.); gloria.crespo@medinaandalucia.es (G.C.); sara.palomo@medinaandalucia.es (S.P.); ignacio.gonzalez@medinaandalucia.es (I.G.); jose.tormo@medinaandalucia.es (J.R.T.); mercedes.delacruz@medinaandalucia.es (M.C.); francisca.vicente@medinaandalucia.es (F.V.); olga.genilloud@medinaandalucia.es (O.G.)

² Institute of Marine and Environmental Technology, University of Maryland Center for Environmental Science, 701 E Pratt Street, Baltimore, MD 21202, USA;

E-Mails: andersomenator@gmail.com (M.A.); hill@umces.edu (R.T.H.)

† Current address: Algenol Biofuels, 16121 Lee Rd Suite 110, Fort Myers, FL 33912, USA.

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: fernando.reyes@medinaandalucia.es; Tel.: +34-958993965; Fax: +34-958846710.

Received: 11 December 2012; in revised form: 9 January 2013 / Accepted: 21 January 2013 /

Published: 4 February 2013

Abstract: A new thiazolyl peptide, kocurin (**1**), was isolated from culture broths of a marine-derived *Kocuria palustris*. Its structural elucidation was accomplished using a combination of spectroscopic and chemical methods, including HRMS, extensive 1D and 2D NMR analysis, MS/MS fragmentation, and chemical degradation and Marfey's analysis of the resulting amino acid residues. The structure herein reported corrects that previously assigned to PM181104 (**3**). Kocurin displayed activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), with MIC values in the submicromolar range.

Keywords: marine-derived bacteria; *Kocuria palustris*; thiazolyl peptides; structure elucidation; antibacterial activity

1. Introduction

The increasing resistance to known antibiotics developed by bacterial pathogens is one of the greatest threats to human health worldwide. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections have received much attention and are still a major cause of death, killing more Americans every year (~19,000) than emphysema, HIV/AIDS, Parkinson's disease, and homicide combined [1]. Therefore, there remains an urgent need to find new anti-MRSA antibiotics with novel modes of action.

Thiazolyl peptides constitute a class of naturally occurring compounds with potent *in vitro* activity against Gram-positive bacteria. The structure of these polycyclic peptides contains a central pyridine/tetrahydropyridine ring, with up to three thiazolyl substituents at the 2-, 3-, and 6-positions of the central heterocycle. This structural class includes close to 100 molecules [2], with the first member, micrococcin, isolated in 1948 [3], and some new members of the thiazomycin family reported as recently as 2009 [4]. Despite its interesting *in vitro* submicromolar antibacterial activity against MRSA, the development of this class of compounds as clinical agents has been hampered due to extremely poor physicochemical properties, most notably low aqueous solubility and unfavorable pharmacokinetics.

As part of our continuing program for the search of new bioactive molecules, 44 bacterial strains of the family *Micrococcaceae* isolated from marine sponges collected in the Florida Keys (USA) were surveyed for the presence of genes encoding non ribosomal peptide synthetase (NRPS) and polyketide synthase (PKS) enzymes and their fermentation extracts were tested for antibiotic activity against clinically relevant strains: Gram-positive bacteria (*Bacillus subtilis* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*), Gram-negative bacteria (*Acinetobacter baumannii*) and yeast (*Candida albicans*). Growth inhibition of MRSA was observed in acetone extracts of three of these strains [5]. This antibacterial activity was reproduced in new fermentations and the active component, kocurin (**1**) (Figure 1), was isolated from one of these strains belonging to the genus *Kocuria* by reversed phase C18 chromatography and semipreparative HPLC, and was identified as a new member of the thiazolyl peptide family of antibiotics. The structural elucidation of kocurin was accomplished using a combination of spectroscopic and chemical methods, including HRMS, extensive 1D and 2D NMR analysis, and chemical degradation and Marfey's analysis of the resulting amino acid residues.

2. Results and Discussion

The producing bacterium, *K. palustris*, was fermented for 1 day in R358 medium. A 7 L fermentation was centrifuged and the cell pellet was extracted with methanol (3 × 50 mL). This extract was chromatographed on a reversed phase C18 column using a gradient H₂O/MeOH and the bioactive fractions were finally purified by repeated semipreparative and preparative HPLC to yield 1.4 mg of **1** as a white solid.

Kocurin (**1**) was assigned a molecular formula of C₆₉H₆₆N₁₈O₁₃S₅ by ESI-TOF mass spectrometry (*m/z* 1515.3739, calc. for [M + H]⁺ 1515.3733). Two absorption maxima in the UV spectrum at 218,

307, and a shoulder at 349 nm together with the presence of five sulphur atoms in the molecular formula of **1** identified the compound as a member of the thiazolyl peptide class. The ^1H NMR spectrum (Table 1) displayed downfield singlets due to the presence of four thiazoles (7.45, 7.86, 8.01 and 8.09 ppm) and two doublets characteristic of a 2,3,6-trisubstituted pyridine ring (8.24 and 8.36 ppm). Other low field proton signals were attributable to protons of the aromatic rings of phenylalanine (7.17, 7.23 and 7.18 ppm) and tyrosine units (6.45 and 6.60 ppm). Three pairs of methylene groups resonating at 5.52 and 6.69 ppm, 5.48 and 6.54 ppm, and 5.38 and 6.58 ppm correlated in the HSQC spectrum with carbons at 102.8, 103.6 and 103.5, respectively, accounting for three dehydroalanine residues. Correlations observed in the HMBC spectrum from these three pairs of proton signals to carbons at 133.9 and 163.1, 134.4 and 162.0, and 132.9 and 165.3 corroborated the identity of these three structural units.

Figure 1. Structures of kocurin (**1**), GE 37468 A (**2**) and PM181104 (**3**).

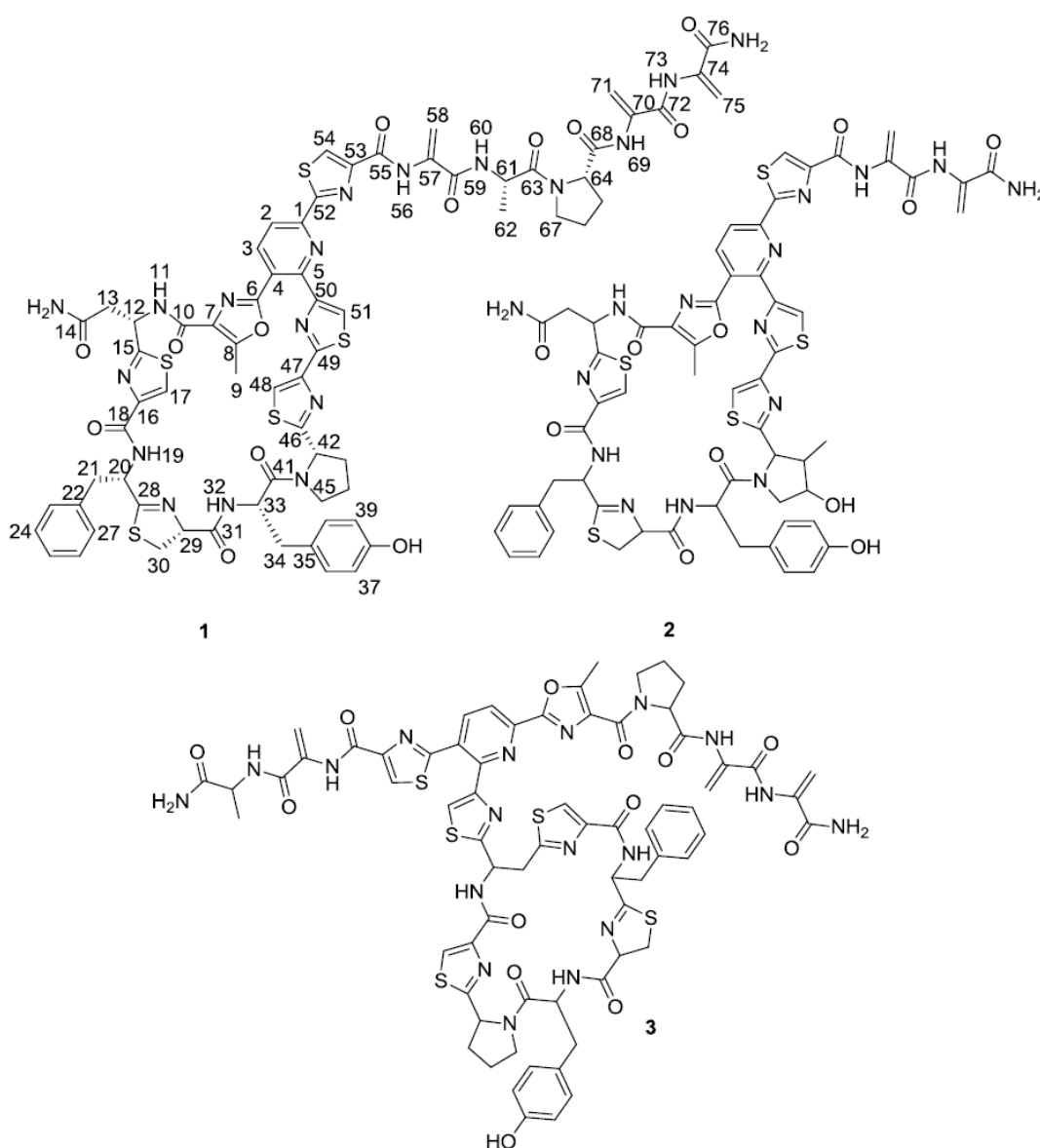


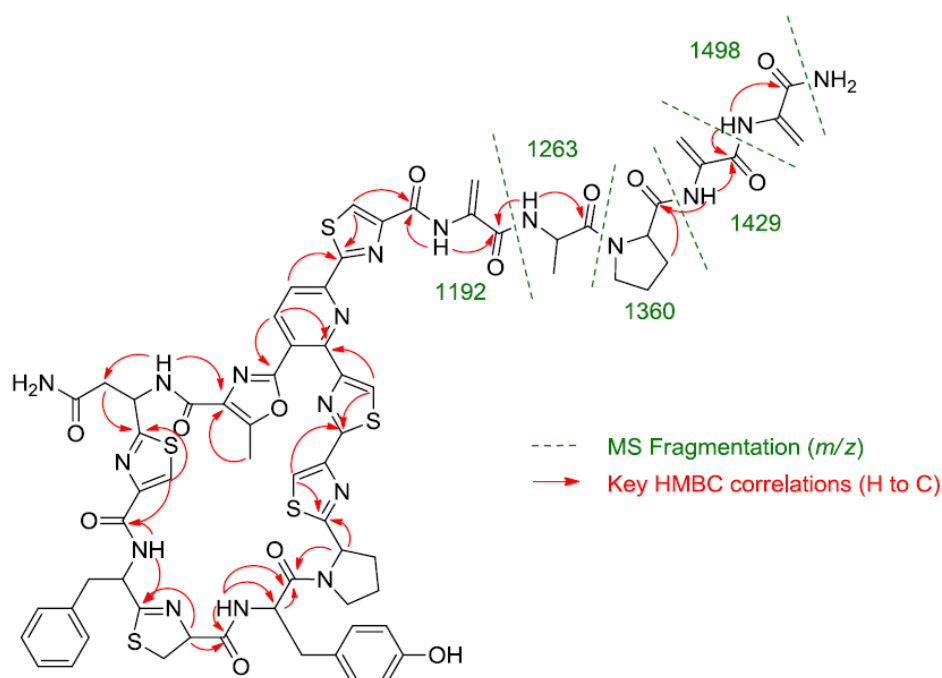
Table 1. ^1H and ^{13}C NMR data (500 and 125 MHz, CDCl_3) for Kocurin (**1**).

No.	δ (C)	δ (H), Multiplicity, <i>J</i>		δ (C)	δ (C), Multiplicity, <i>J</i>
1	150.8		39	117.6	6.45, d, 8.2
2	138.6	8.36, d, 8.2	40	131.1	6.60, d, 8.2
3	118.6	8.24, d, 8.2	41	170.5	
4	122.5		42	61.7	5.33, t, 7.5
5	151.4		43	34.2	2.58, m; 2.07, m
6	155.8		44	25.7	2.37, m; 2.17, m
7	129.9		45	48.2	3.99, m, 2H
8	154.2		46	173.5	
9	12.1	2.88, s, 3H	47	148.6	
10	163.1		48	114.0	7.45, s
11		8.65, d, 9.7	49	159.7	
12	47.7	4.90, m	50	154.2	
13	37.6	2.16, m 0.50, dd, 17.4, 3.0	51	122.5	8.01, s
14	172.3		52	167.9	
15	171.9		53	151.4	
16	149.0		54	127.0	8.29, s
17	122.4	7.86, s	55	159.4	
18	160.3		56		10.05, s
19		8.35, d, 6.4	57	133.9	
20	53.5	5.13, m	58	102.8	6.69, br s; 5.52, br s
21	39.0	3.58, m 3.36, dd, 14.0, 3.1	59	163.1	
22	135.7		60		7.44, d, 7.4
23	129.9	7.23, d, 7.8	61	47.6	4.90, m
24	128.4	7.28, t, 7.8	62	18.4	1.55, d, 6.8, 3H
25	127.2	7.17, t, 7.8	63	172.3	
26	128.4	7.28, t, 7.8	64	61.1	4.71, dd, 7.8, 3.3
27	129.9	7.23, d, 7.8	65	27.8	2.38, m; 2.09, m
28	172.9		66	25.1	2.17, m; 2.09, m
29	78.3	4.83, ddd, 13.3, 8.7, 2.6	67	47.3	3.71, m, 2H
30	35.9	3.76, m; 3.58, m	68	169.6	
31	169.1		69		8.89, s
32		7.40, d, 9.3	70	134.4	
33	51.4	5.21, m	71	103.6	6.54, d, 1.9 5.48, br s
34	36.4	3.14, dd, 14.1, 3.0 2.94, dd, 14.1, 4.5	72	162.0	
35	125.6		73		8.86, s
36	131.1	6.60, d, 8.2	74	132.9	
37	117.6	6.45, d, 8.2	75	103.5	6.58, d, 1.4 5.38, br s
38	155.6		76	165.3	

Other building blocks identified in the ^1H NMR spectrum and confirmed via COSY, HSQC and HMBC correlations were an asparagine unit (8.65, 4.90, 2.56 and 0.50 ppm), an alanine (7.44, 4.90 and 1.55 ppm), two prolines and a thiazoline ring (4.83, 3.76, and 3.58 ppm). The unusual low field chemical shift of the methine carbon of the latter residue (78.3 ppm) was due to the presence of a cyclic secondary ketimine bond in addition to the downfield effect of the adjacent carbonyl group. Finally, one methyloxazole residue was also present in the structure of **1** as revealed by the presence of a singlet methyl group at δ_{H} 2.88 ppm that correlated in the HMBC spectrum to 3 carbons at δ_{C} 129.9 (C-7), 155.8 (C-8) and 163.1 (C-10, weak, 4-bond correlation).

Once all the subunits present in the structure of the new peptide were identified, the sequence of amino acids was established by analysis of key correlations observed in the HMBC spectrum (Figure 2) and MS/MS analysis. HMBC correlations confirmed that the central pyridine nucleus was surrounded by two of the thiazolyl and the methyloxazole units and allowed the planar structure of the compound to be established as depicted in Figure 2. Additional support for the sequence determined by HMBC came from the analysis of key fragments observed in the MS/MS spectrum of the molecule. Thus, the sequence Dha-Dha-Pro-Ala for the C-terminal amino acid side chain was determined from fragments at m/z 1498, 1429, 1360, 1263, and 1192 (Figure 2). The planar structure of kocurin was found to be similar to that of the antibiotic peptide GE 37468 A (**2**) [6,7], the major structural differences found between both compounds being the replacement of the methylhydroxyproline unit in the cycle of **2** by proline in **1** and the presence of additional amino acid units in the side chain of the latter compound.

Figure 2. Key HMBC correlations and MS/MS fragments observed in the spectra of kocurin (**1**).

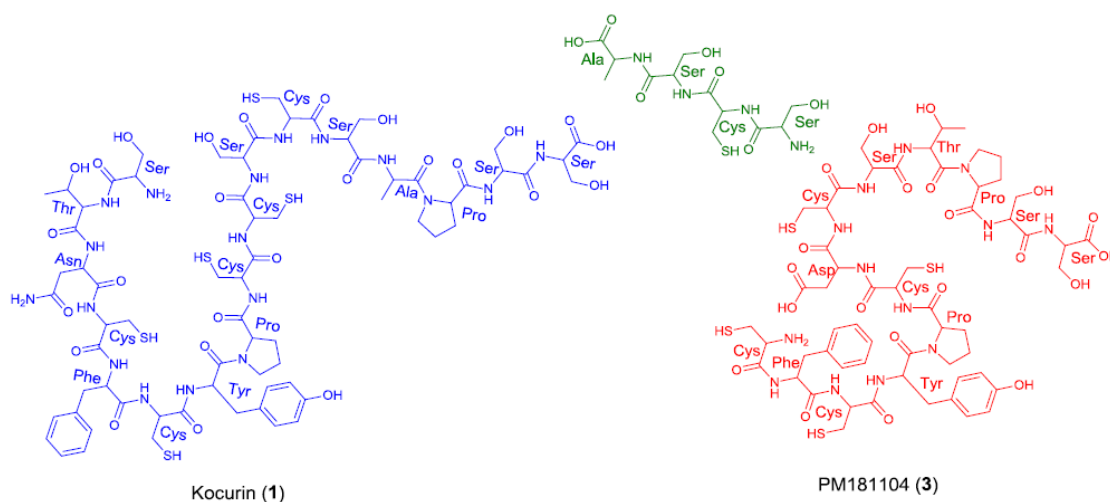


The absolute configurations of the amino acid residues in kocurin were determined by application of the Marfey's methodology [8]. A hydrolysis of the sample with HCl 6 N (110 °C, overnight) and derivatization of the hydrolysate with 1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L-valinamide (L-FDVA) revealed the presence of L-Tyr, L-Pro ($\times 1$) and L-Ala on the basis of comparison of their retention times with those of derivatized standards. In order to liberate those amino acids adjacent to thiazole rings to determine their absolute configurations, it was necessary to cleave these by ozonolysis prior to hydrolysis. Treatment of a solution of **1** in CHCl₃/MeOH with ozone for 10 min followed by acid hydrolysis with 6 N HCl (110 °C, overnight) and derivatization with L-FDVA identified L-Asp, L-Phe, L-Cya, L-Pro ($\times 2$) and L-Ala as components of the hydrolyzate by LC/MS. Tyr was not found in this analysis, probably due to its decomposition during the ozonization of the peptide. The ozonolysis of the sample prior to the acid hydrolysis had the additional advantage of reducing the epimerization of the thiazoline present in the molecule, which has been described to readily occur in the presence of mild acid or base. A 1.6:1 ratio of L- and D-Cya was obtained in the LC/MS analysis, confirming L-Cys as the residue present in the structure of kocurin. The L-Cys assignment was also supported by comparative ¹H and ¹³C NMR data of the thiazoline in **1** to those reported for other molecules containing the same residue.

Once the complete structure of the compound had been determined, a literature search revealed the existence of two patents describing compounds having the same molecular formula as kocurin, the thiazolyl peptide PM181104 (**3**), isolated from a marine-derived *Kocuria* sp. (ZMA B-1/MTCC 5269) [9] and a molecule with the same planar structure as kocurin obtained from *Kocuria* sp. Strain MI-67-EC3-038, isolated from a marine sample collected in the Southeast coast of Spain [10]. Although no explanation is given in the first patent about the rationale followed in the structural elucidation of **3**, we believe that kocurin and PM181104 are actually the same molecule. Although the same residues can be identified by NMR in both structures, on the basis of biogenetic grounds we firmly believe that the structure proposed for **3** is not correct, probably due to a misinterpretation of some HMBC correlations observed for carbons resonating very closely, and that the actual compound isolated in the work described in the patent has the structure herein proposed for kocurin. It is well known that thiazolyl peptides arise from a cascade of post-translational modifications on 50 to 60 residue pre-peptide precursors that trim away the *N*-terminal leader sequences (40 residues) while at the *C*-terminal, 14 to 18 residues are converted into the mature scaffold [11]. In this sense, kocurin would be the result of post-translational modifications of a linear *C*-terminal peptide containing 17 amino acids (Ser-Thr-Asn-Cys-Phe-Cys-Tyr-Pro-Cys-Cys-Ser-Cys-Ser-Ala-Pro-Ser-Ser) whereas the biosynthesis of PM181104 would require the participation of two independent peptide units of 13 (Cys-Phe-Cys-Tyr-Pro-Cys-Asp/Asn-Cys-Ser-Thr-Pro-Ser-Ser) and 4 (Ser-Cys-Ser-Ala) amino acid residues (Figure 3). A second inconsistency in the structure proposed for compound **3** is the presence of two *C*-terminal amino acids. Due to this, the MS/MS fragmentation pattern generated by this compound should contain additional ions to those observed for **1**, originated by losses of amino acids from both side chains. Among others, ions at *m/z* 1427 and 1358 accounting for the elimination of the terminal alanine and alanine-DHA residues in PM181104, not observed in the spectrum of kocurin, should appear in the MS/MS spectrum of the molecule. Unfortunately, no MS/MS fragmentation of PM181104 is reported in the patent and only the molecular ion of the compound is included as part of the structural information. Finally, a comparison of the ¹H NMR in DMSO-*d*₆ of kocurin with that reported in the patent for PM181104 definitely confirms that both molecules are identical.

The biological activity of kocurin was tested against a panel of bacterial and fungal pathogens, including wild-type MRSA and *S. aureus* strains resistant to thiazomycin, other Gram-positive (*Bacillus subtilis* and *Enterococcus faecium*) and Gram-negative (*Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*) bacteria and one fungus (*Candida albicans*). Kocurin strongly inhibited the growth of MRSA MB5393 with a MIC value of 0.25 $\mu\text{g/mL}$. In addition, the compound also displayed antibacterial activity against *B. subtilis* and *E. faecium* in a solid agar test, with zones of inhibition (ZOI) of 9 and 10 mm when tested at a concentration of 8 $\mu\text{g/mL}$. On the other hand, the compound displayed ZOI of 5 mm when a 10 μL aliquot of a 2 $\mu\text{g/mL}$ solution was spotted on plates containing cultures of both, wild-type and thiazomycin resistant *S. aureus* strains, revealing that the mechanism of action of the compound is different from that of thiazomycin. Finally, kocurin did not inhibit the growth of Gram-negative bacteria or *C. albicans* when tested at a concentration of 16 $\mu\text{g/mL}$.

Figure 3. Structural units required for the biosynthesis of kocurin (1) and PM181104 (3).



3. Experimental Section

3.1. General Experimental Procedures

Optical rotations were determined using a JASCO P-2000 polarimeter. UV spectra were obtained with an Agilent 1200 DAD. NMR spectra were recorded on a Varian “INOVA 500” spectrometer at 500/125 MHz ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$). Chemical shifts were reported in ppm using residual CDCl_3 (δ 7.26 for ^1H and 77.0 for ^{13}C) as internal reference. HMBC experiments were optimized for a $^3J_{\text{CH}}$ of 8 Hz. (+)-ESI-TOFMS was performed on a Bruker maXis spectrometer.

3.2. Producing Microorganism

The producing strain F-276,345 was obtained from a sponge sample collected in Florida Keys, USA [12]. Upon phylogenetic analysis based on partial 16S rRNA gene sequences of related type species, the strain F-276,345 was identified as a new member of the species *Kocuria lacustris* [5].

3.3. Fermentation of the Producing Microorganism

A 7.2 liter fermentation of *Kocuria palustris* F-276,345 was obtained as follows: a first seed culture of the strain F-276,345 was prepared by inoculating three 50 mL tubes containing 12 mL each of MY seed medium (D-(+)-Glucose 10 g/L, Bacto Yeast Extract 3 g/L, Proteose-peptone 5 g/L, Malt Extract 3 g/L, adjusted to pH 7.0), with 0.5 mL of a frozen inoculum stock of the producing strain and incubating the tube at 28 °C with shaking at 220 rpm for about 24 h. A second seed culture was prepared by inoculating eight 250 mL flasks containing 50 mL each of MY seed medium with 2.5 mL of the first seed. A 5% aliquot of the second seed culture was transferred to each of the forty-eight 500 mL flasks containing 150 mL of the production medium R358, which is a modified version of the one used by Jensen *et al.* [13], which consists of starch from potato 10 g/L, Bacto Yeast Extract 4 g/L, Bacto Peptone 2 g/L, FeSO₄·7H₂O (5 mL of a 8 g/L stock solution), and KBr (5 mL of a 20 g/L stock solution) at pH 7.0. The flasks were incubated at 28 °C for 1 day in a rotary shaker at 220 rpm and 70% humidity before harvesting.

3.4. Extraction and Isolation

The culture broth was centrifuged for 15 min at 8500 rpm and the supernatant was discarded. The cell pellet was extracted with MeOH (3 × 50 mL), filtered and the solvent was evaporated to dryness. The dried extract was subjected to reversed phase flash chromatography (15.5 g of RediSep C18, gradient from 20% MeOH to 100% MeOH in 12.5 min + 100% MeOH for 10 min, 10 mL/min, UV detection at 210 and 305 nm) yielding a fraction eluting between 12.5 and 14.4 min that was subjected to semipreparative HPLC (X-Bridge Phenyl, 10 × 15 mm, 5 μm, gradient H₂O–CH₃CN from 25% to 80% CH₃CN in 35 min, 3.6 mL/min, UV detection) to yield 1.4 mg of kocurin (**1**) as a white amorphous solid.

Data for kocurin (**1**): White amorphous solid; $[\alpha]_D^{25} +27.0$ (*c* 0.11, CHCl₃/MeOH 1:1); UV (DAD) λ_{\max} 218, 307, 349 (sh) nm; IR (ATR) ν_{\max} 3342, 2922, 2853, 1649, 1512, 1427 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR: see Table 1; (+)-ESI-TOFMS *m/z* 1515.3739 [M + H]⁺ (calc. for C₆₉H₆₆N₁₈O₁₃S₅, 1515.3733, Δ 0.3 ppm).

3.5. Ozonolysis, Acid Hydrolysis, and Marfey's Analysis of Kocurin (**1**)

A sample of kocurin (0.1 mg, 50 mM) was treated with 6 N HCl in a sealed vial at 110 °C for 24 h. The solution was concentrated to dryness *in vacuo*. The hydrolysate was reconstituted in H₂O (50 μL) and treated with a solution of 1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L-valine-amide (L-FDVA, 150 μL, 1% in acetone) and a 1 M solution of NaHCO₃ (20 μL) in a sealed vial at 40 °C for 1 h. The reaction mixture was neutralized with 1 N HCl (20 μL) and an aliquot (10 μL) was diluted with CH₃CN (40 μL). The resulting solution was analyzed by LC-MS employing a Waters X-Bridge C18 column (4.6 × 150 mm, 5 μm) and a gradient elution profile of 10% B (90% CH₃CN, 10% H₂O, 1.3 mM TFA, 1.3 mM ammonium formiate)/90% A (10% CH₃CN, 90% H₂O, 1.3 mM TFA, 1.3 mM ammonium formiate) to 55% B/45% A over 35 min at flow of 1 mL/min. The hydrolysate of kocurin contained L-Ala (13.7 min), L-Pro (14.9 min) and L-Tyr (30.5 min). The retention time of the L-FDVA derivatives of the authentic amino acids were as follows: L-Ala (13.8 min), D-Ala (18.3 min), L-Pro (14.9 min), D-Pro (18.1 min), L-Tyr (30.6 min) and D-Tyr (34.8 min).

A second sample (0.2 mg) of the peptide was dissolved in 2 mL of CHCl₃/CH₃OH, and ozone was bubbled through the solution for 10 min. This solution was evaporated to dryness on a rotary evaporator. Subsequent hydrolysis and Marfey's analysis of the resulting residue was performed as described above. The resulting solution was analyzed by LC-MS employing a Waters X-Bridge C18 column (4.6 × 150 mm, 5 μm) and a gradient elution profile of 10% B/90% A to 35% B/65% A over 35 min and then to 100% B in 1 min and held at 100% B for 4 min using a flow of 1 mL/min. The hydrolysate of the ozonolysis product gave L-Ala (19.0 min), L-Asp (14.1 min), L-Phe (35.2 min) and L-Pro (21.4 min). The retention time of the L-FDVA derivatives of the authentic amino acids were as follows: L-Ala (19.0 min), D-Ala (28.5 min), L-Asp (14.1 min), D-Asp (16.4 min), L-Phe (34.6 min), D-Phe (37.8 min), L-Pro (20.8 min) and D-Pro (27.3 min). A second chromatographic method using the same solvent system as the previous methods (Waters X-Bridge C18 column (4.6 × 150 mm, 5 μm) and isocratic elution 3% B/97% A over 35 min at flow of 1 mL/min) was used for the identification of the L-Cya residue (17.4 min) (Cya L:D, 1.5:1). The retention times of the L-FDVA derivatives of cysteic acid were: L-Cya (17.4 min), D-Cya (18.5 min).

3.6. Antifungal Assays

Frozen stocks of *C. albicans* were used to inoculate Sabouraud Dextrose Agar (SDA) plates for confluent growth. Plates were incubated for 24 h, at 35 °C. The grown colonies were harvested from the SDA plates and suspended in RPMI-1640 modified medium. Modified RPMI-1640 medium was prepared as follows: 20.8 g of RPMI powder (Sigma) were poured into a 2 L flask, together with 13.4 g of YNB, 1.8 L of milliQ water, 80 mL of 1 M HEPES and 72 mL of glucose 50%. The volume was adjusted to 2 L and filtered. The OD₆₆₀ was adjusted to 0.25 using RPMI-1640 modified as diluent and blank. This inoculum was diluted 1:10 and kept on ice until used to inoculate 96-well microtiter plates. For the assay, 90 μL/well of the 1:10 diluted inoculum were mixed with 1.6 μL/well of compound solution in DMSO and 8.4 μL/well of RPMI-1640 modified medium. Amphotericin B and Penicillin G were used as internal positive and negative controls respectively. After dispensing the inocula, the samples and the controls, the assay plates were read in a Tecan Ultraevolution spectrophotometer at 612 nm for T_0 (zero time). Then, the plates were statically incubated at 37 °C for 20 h. After incubation, the plates were shaken in a DPC Micromix-5 and read again for T_f (final time). Percentage of growth inhibition was calculated using the following equation:

$$\% \text{ Inhibition} = 100 \times \left\{ 1 - \frac{[(T_{f \text{ Sample}} - T_{0 \text{ Sample}}) - (T_{f \text{ Blank}} - T_{0 \text{ Blank}})]}{[(T_{f \text{ Growth}} - T_{0 \text{ Growth}}) - (T_{f \text{ Blank}} - T_{0 \text{ Blank}})]} \right\} \quad (1)$$

Compound **1** was serially diluted in DMSO with a dilution factor of 2 to provide 10 concentrations starting at 160 μg/mL. The MIC was defined as the lowest concentration of an antimicrobial or antifungal compound that inhibited ≥95% of the growth of a microorganism after overnight incubation. The data were analysed using the Genedata Screener program (Genedata AG, Switzerland). In all experiments performed in this work the RZ' factor obtained was between 0.85 and 0.95.

3.7. Antibacterial Assays

For the liquid media antibacterial tests, thawed stock inocula suspensions from cryovials of each microorganism (MRSA, *A. baumannii*, *E. coli* and *P. aeruginosa*) were streaked onto Luria-Bertani agar plates (LBA, 40 g/L) and incubated at 37 °C overnight to obtain isolated colonies. Single colonies of each microorganism were inoculated into 10 mL of Luria-Bertani broth medium (LB, 25 g/L in 250 mL Erlenmeyer flasks) and incubated overnight at 37 °C with shaking at 220 rpm and then diluted in order to obtain assay inocula of approximately 1.1×10^6 CFU/mL (MRSA) or $5\text{--}6 \times 10^5$ CFU/mL (*A. baumannii*, *E. coli* and *P. aeruginosa*).

For the assay 90 µL/well of the diluted inoculum were mixed with 1.6 µL/well of each compound dissolved in DMSO and 8.4 µL/well of LB medium. Kanamycin and amphotericin B (MRSA), rifampicin and amphotericin B (*A. baumannii*), novobiocin and amphotericin B (*E. coli*), and ciprofloxacin and amphotericin B (*P. aeruginosa*) were included as internal plate controls. Absorbance at 612 nm was measured with a Tecan UltraEvolution spectrophotometer (Tecan, Durham, USA) at T_0 (zero time) and immediately after that, plates were statically incubated at 37 °C for 20 h. After this period, the assay plates were shaken using the DPC Micromix-5 and once more the absorbance at OD 612 nm was measured at T_f (final time). Percentage inhibition of growth was calculated using the same equation previously described for *C. albicans*.

Assays in solid agar plates were performed in order to determine the antimicrobial susceptibility of kocurin against *B. subtilis* MB964, *E. faecium* MB5571 resistant to vancomycin and β-lactam antibiotics and thiazomycin-resistant *S. aureus* strains. The *B. subtilis* MB964 assay plates were prepared by adding 1 mL (1.5×10^8 CFU/mL) of a spore suspension (Difco) directly to 1 liter of cooled nutrient agar yeast extract medium (NAYE, nutrient agar 23 g/L, yeast extract 2 g/L). The *E. faecium* strain was grown in a shaken (220 rpm) culture of brain heart infusion broth (BHI, 37 g/L) at 37 °C. The assay plates were prepared by inoculating the same cooled media plus agar (15 g/L) with 3.3% of the inoculum adjusted to an optical density (OD) range of 0.22–0.35 at 660 nm. The wild-type *S. aureus* Smith MB2865 and thiazomycin-resistant *S. aureus* MB5832 strains were grown in 10 mL of LB medium overnight. Overnight growth was adjusted to an optical density of 0.2 at 600 nm. The suspension was then added to molten LB agar in the proportion of 25 mL/L. The activity was determined by measuring the differences of the zone of clearances observed between the wild type versus the resistant plate. Compound **1** was serially diluted in DMSO 20% with a dilution factor of 2 to provide 10 compound concentrations starting at 128 µg/mL for all the agar assays. Ten microliters of each compound concentration were applied to the agar plate containing the pathogenic microorganism.

4. Conclusions

A thiazolyl peptide bioactive against MRSA, kocurin (**1**), has been isolated from cultures of the marine sponge-derived bacterium *Kocuria palustris*. Its challenging structural elucidation was completed using a combination of spectroscopic and chemical methods, including HRMS, extensive 1D and 2D NMR analysis, MS/MS fragmentation, and chemical degradation and Marfey's analysis of the resulting amino acid residues. The structure herein proposed for the compound corrects that previously reported for PM181104 in a US patent. The identification of a new bioactive compound in a member of

the *Micrococaceae* suggests that this family of actinomycetes represents an alternative source for the discovery of new medically relevant small molecules. The relative abundance in marine environments, intra-familial diversity, and ease of growth of these bacteria makes them an attractive target for the discovery of new antibiotics.

Acknowledgments

The authors thank the assistance of Catalina Moreno in the preparation of the extracts and Dr. Ignacio Pérez-Victoria for recording the NMR experiments. The polarimeter, IR and NMR equipment used in this work were purchased via two grants for scientific and technological infrastructures from the Ministerio de Ciencia e Innovación [Grants No. PCT-010000-2010-4 (NMR) and INP-2011-0016-PCT-010000-ACT6 (Polarimeter and IR)]. This is contribution No. 13104 from the Institute of Marine and Environmental Technology and contribution No. 4728 from the University of Maryland Center for Environmental Science.

References

1. Klevens, R.M.; Morrison, M.A.; Nadle, J.; Petit, S.; Gershman, K.; Ray, S.; Harrison, L.H.; Lynfield, R.; Dumyati, G.; Townes, J.M.; *et al.* Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *JAMA* **2007**, *298*, 1763–1771.
2. Bagley, M.C.; Dale, J.W.; Merritt, E.A.; Xiong, X. Thiopeptide antibiotics. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 685–714.
3. Su, T.L. Micrococcin, an antibacterial substance formed by a strain of *Micrococcus*. *Br. J. Exp. Pathol.* **1948**, *29*, 473–481.
4. Zhang, C.; Herath, K.; Jayasuriya, H.; Ondeyka, J.G.; Zink, D.L.; Occi, J.; Birdsall, G.; Venugopal, J.; Ushio, M.; Burgess, B.; *et al.* Thiazomycins, thiazolyl peptide antibiotics from *Amycolatopsis fastidiosa*. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 841–847.
5. Palomo, S.; González, I.; de la Cruz, M.; Martín, J.; Tormo, J.R.; Anderson, M.; Hill, R.T.; Vicente, F.; Reyes, F.; Genilloud, O. Sponge-derived *Kocuria* and *Micrococcus* spp. as new sources of thiazolyl peptide antibiotics. *Mar. Drugs* **2013**, submitted.
6. Ferrari, P.; Colombo, L.; Stella, S.; Selva, E.; Zerilli, L.F. Antibiotic GE37468 A: A novel inhibitor of bacterial protein synthesis. II. Structure elucidation. *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 1304–1311.
7. Stella, S.; Montanini, N.; Le Monnier, F.; Ferrari, P.; Colombo, L.; Marinelli, F.; Landini, P.; Ciciliato, I.; Goldstein, B.P.; Selva, E.; *et al.* Antibiotic GE37468 A: A new inhibitor of bacterial protein synthesis. I. Isolation and characterization. *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 780–786.
8. Marfey, P. Determination of D-amino acids. II. Use of a bifunctional reagent, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene. *Carlsberg Res. Commun.* **1984**, *49*, 591–596.
9. Mahajan, G.B.; George, S.D.; Ranadive, P.V.; Mishra, P.D.S.; Eyyammadichiyil, S.S.; Panshikar, R.M.; Sawant, S.N.; Krishna, S.; Sivakumar, M.; Pari, K.; *et al.* PM181104 and Related Antibacterial Compounds, Production, Pharmaceutical Compositions, and Therapeutic Use. PCT Int. Appl. WO 2007119201A2, 25 October 2007.

10. Cañedo Hernández, L.M.; Romero Millán, F.; Fernández Medarde, A.; Fernández Chimeno, R.I.; Hidalgo Villar, J.C. Peptides as bioactive compounds. PCT Int. Appl. WO 2012062906A1, 18 May 2012.
11. Walsh, C.T.; Acker, M.G.; Bowers, A.A. Thiazolyl peptide antibiotic biosynthesis: A cascade of post-translational modifications on ribosomal nascent proteins. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 27525–27531.
12. Montalvo, N.; Mohamed, N.; Enticknap, J.; Hill, R. Novel actinobacteria from marine sponges. *Antonie Van Leeuwenhoek* **2005**, *87*, 29–36.
13. Jensen, P.R.; Williams, P.G.; Oh, D.-C.; Zeigler, L.; Fenical, W. Species-specific secondary metabolite production in marine actinomycetes of the Genus *Salinispora*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 1146–1152.

Samples Availability: Not available.

© 2013 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).