



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**JEAN MICHEL ROCHA SAMPAIO LEITE**

**POTENCIAL ANTITUMORAL DE EXTRATOS E DE FRAÇÕES OBTIDOS DE  
MICRORGANISMOS ASSOCIADOS AOS ZOANTÍDEOS *Palythoa caribaeorum* e  
*Palythoa variabilis* DA COSTA CEARENSE E DO ARQUIPÉLAGO FERNANDO DE  
NORONHA**

**FORTALEZA**

**2015**

JEAN MICHEL ROCHA SAMPAIO LEITE

POTENCIAL ANTITUMORAL DE EXTRATOS E DE FRAÇÕES OBTIDOS DE  
MICRORGANISMOS ASSOCIADOS AOS ZOANTÍDEOS *Palythoa caribaeorum* e  
*Palythoa variabilis* DA COSTA CEARENSE E DO ARQUIPÉLAGO FERNANDO DE  
NORONHA

Monografia apresentada ao curso de Ciências  
Biológicas do Departamento de Biologia da  
Universidade Federal do Ceará, como  
requisito parcial para obtenção de título de  
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Diego Veras Wilke.

FORTALEZA

2015

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

- 
- L553p Leite, Jean Michel Rocha Sampaio.  
Potencial antitumoral de extratos e de frações obtidos de microrganismos associados aos zoantídeos *Palythoa caribaeorum* e *Palythoa variabilis* da costa cearense do arquipélago Fernando de Noronha / Jean Michel Rocha Sampaio Leite. – 2015.  
50 p. : il., color.
- Monografia (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Biologia, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2015.  
Orientação: Prof. Dr. Diego Veras Wilke.
1. Invertebrado marinho. 2. Actinomicetos. 3. Agentes antineoplásicos. I. Título.

JEAN MICHEL ROCHA SAMPAIO LEITE

POTENCIAL ANTITUMORAL DE EXTRATOS E DE FRAÇÕES OBTIDOS DE  
MICRORGANISMOS ASSOCIADOS AOS ZOANTÍDEOS *Palythoa caribaeorum* e  
*Palythoa variabilis* DA COSTA CEARENSE E DO ARQUIPÉLAGO FERNANDO DE  
NORONHA

Monografia apresentada ao curso de Ciências  
Biológicas do Departamento de Biologia da  
Universidade Federal do Ceará, como  
requisito parcial para obtenção de título de  
Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada em 29/06/2015.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Diego Veras Wilke (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Denise Cavalcante Hissa  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dr<sup>a</sup>. Maria da Conceição de Menezes Torres  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

FORTALEZA

2015

Dedico este trabalho à minha mãe, Átila  
Rocha Sampaio, a pessoa que me inspirou  
todos os dias da minha vida e que me mostrou  
o que é amor, compaixão, força, trabalho duro  
e honra.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à minha mãe Átila Rocha Sampaio. Você é o maior exemplo de pessoa íntegra, bondosa, guerreira que já encontrei na vida. Não tenho palavras para agradecer todo o carinho, apoio e amor que recebi e que me ajudou a me tornar o homem que sou hoje. Ao meu pai Diamantino Loureiro Leite, pela esplêndida educação, carinho e amor recebidos. Ao meu avô Renato da Silva Sampaio, por ser um exemplo de luta, cuidado e perseverança, obrigado por todos os puxões de orelha e apoio incondicional. À minha doce avó Clarice Alves Rocha Sampaio, pelo seu imenso cuidado, preocupação e confiança na minha capacidade. À toda a minha família, irmãos, tias, tios, primos e primas, por todo o apoio, sábias repreensões, amor e carinho.

Ao Prof. Dr. Diego Veras Wilke, pela esplêndida orientação, suporte, entusiasmo e paciência durante minha jornada em seu laboratório e à Prof<sup>a</sup>. Dra. Leticia Costa-Lotufu, por ser uma grande inspiração como pessoa, professora e pesquisadora.

À banca examinadora composta pelo meu orientador Prof. Dr. Diego Veras Wilke, a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Denise Hissa Cavalcante e Dr<sup>a</sup>. Maria da Conceição de Menezes Torres, muito obrigado por avaliarem meu trabalho e contribuírem para sua melhora. Me sinto muito grato por compartilharem sua paixão pela ciência comigo.

A toda família LabbMar/Ecotox, Larissa, Daku, Elthon, Evelyne, Katharine, Luciana, Carol, Évila, Kayanny, Renata, Prof. Amaro, Matheus, Marcionília, Allan, Alysson, Fernando, Pedro, Raianna, pela imensa paciência, apoio e alegria transmitidas a mim. Vocês são mais um presente de Deus na minha vida.

A Francisco Chagas, Karisia Sousa, Ceixa e demais integrantes do Laboratório de Análise Fitoquímica de Plantas Medicinais da UFC pela supervisão, apoio e imensa ajuda durante a realização de extrações, técnicas cromatográficas e análises químicas. Obrigado por me fazerem lembrar o quão apaixonante a química é.

Aos meus amigos tão especiais Lorena Carvalho, Lanaya Diniz, Aline Neris, Arthur Souza de Lima, Neto Neshy, Allison Miyashiro, Michael Torrisi, Jessica Ortega e tantos outros sobre

os quais gastaria muitas páginas para mencionar, obrigado por iluminarem meus dias e me darem tanto carinho e suporte. Espero poder levar vossa amizade para sempre.

Aos meus muitos amigos, companheiros e professores de dança, especialmente a Michelle Fontenelle, Nilton César do Nascimento e Lucian Charada, obrigado por compartilharem dessa paixão tão grande e terem me ensinado tanto durante esses 5 anos de muito jazz, hip hop, ballet e tantos outros estilos.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) e à CAPES pela bolsa de iniciação científica a mim concedida e apoio financeiro para o desenvolvimento deste projeto, respectivamente.

**“Quando a gente abre as mãos, nelas cabe  
todo o universo.” (Monja Cohen)**



## RESUMO

Desde muito tempo, o mundo tem buscado incessantemente maneiras de se prevenir, tratar e curar pessoas acometidas por câncer. Apesar dos inúmeros esforços empregados, essa doença é ainda um dos grandes problemas de saúde da atualidade, o que encoraja a busca por novas fontes com potencial anticâncer. Os invertebrados marinhos figuram como uma fonte promissora de compostos com potencial antitumoral. Considerando os diversos indícios de que os microrganismos associados a esses animais desempenham um papel fundamental na produção de compostos bioativos, esse trabalho teve o objetivo de avaliar o potencial antitumoral de actinomicetos associados aos zoantídeos *Palythoa caribaeorum* e *Palythoa variabilis* do arquipélago Fernando de Noronha e da costa cearense, respectivamente. Após o isolamento e cultivo dos actinomicetos identificados como BRA – 350 e 351, fez-se avaliação da atividade antiproliferativa dessas culturas pelo ensaio do MTT. A extração, fracionamento, bem como a avaliação da atividade antiproliferativa, foram realizadas para outra linhagem previamente isolada do zoantídeo *Palythoa variabilis*, BRA – 036. As frações obtidas foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD). Adicionalmente, buscou-se determinar o tempo ótimo de cultivo no intervalo de 10 dias das linhagens ativas para obtenção do extrato mais ativo. Os extratos obtidos de BRA-350 e BRA-351 isolados do *P. caribaeorum* não apresentaram efeito antiproliferativo até 50 µg/mL. Já o extrato bruto de BRA-036 foi bastante ativo, que apresentou concentração inibitória média (CI<sub>50</sub>) de 4,28 ng/mL. A análise das frações por CCD sugeriu a presença de compostos indólicos, possivelmente dicetopiperazinas, as quais possuem implicações em diversas atividades biológicas. Das frações derivadas do extrato bruto de BRA – 036, a mais ativa correspondeu à obtida com AcOEt/MeOH (2:1). O tempo ótimo de cultivo de BRA – 036 no qual o extrato foi mais ativo foi 2 dias, o que contribui para a otimização temporal da bioprospecção de compostos com potencial antitumoral produzidos por esse actinomiceto. Esses resultados ressaltam o potencial antitumoral da microbiota associada aos zoantídeos *P. caribaeorum* e *P. variabilis* e despertam o interesse em isolar e identificar as moléculas produzidas pelos actinomicetos a eles associados.

**Palavras-chave:** Câncer. Invertebrados marinhos. Actinomicetos. Bioprospecção. Atividade antiproliferativa. Fracionamento.

## ABSTRACT

The world has effortlessly sought ways to prevent, treat and cure people with cancer for a long time. Despite many research efforts, this disease is still one of the biggest health-issues, which encourages one to look for new sources with anticancer properties. Marine invertebrates are very promising as a source of potential antitumoral compounds. Considering that there are many evidences suggesting that microorganisms associated with these animals play a fundamental role in the production of these compounds, this study aimed to evaluate the antitumoral potential of actinomycetes, associated with *Palythoa caribaeorum* and *Palythoa variabilis* of Fernando de Noronha archipelago and Ceará coast. The antiproliferative activity of the actinomycetes named as BRA – 350 e 351 was evaluated using the MTT assay, after the isolation and extraction of those cultures. The extraction, fractionation and antiproliferative activity was also evaluated for the strain BRA – 036, which was isolated previously from *Palythoa variabilis*. The fractions were also analyzed with thin layer chromatography (TLC). Additionally, the optimum time to obtain the most active extract in a 10-days cultures of BRA – 036. The inhibition percentage of 5 µg/mL of BRA – 036-derived extract in HCT – 116 cells was 87.43 %. On the other hand, *P. caribaeorum*-associated actinomycetes did not significantly inhibit HCT – 116 growth. The analysis using TLC evidenced the presence of indolic compound, potentially diketopiperazines, which can be empowered of multiple biological activities. The fraction of BRA – 036 with the highest activity was the one obtained with AcOEt/MeOH (2:1). The half maximum inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) calculated for BRA – 036 was 4,28 ng/mL, which demonstrated the extract's potency. As the optimum time to obtain the most potent extract was 2 days, this result contributes for timing-optimization of bioprospecting of compounds with anti-tumoral activities produced by this actinomycete. The findings presented in this study highlight the anti-tumoral potential of microbes associated with the zoantids *P. caribaeorum* e *P. variabilis* and inspire the scientific community to isolate and identify the molecules presented in its extracts.

**Keywords:** Cancer. Marine invertebrates. Actinomycetes. Bioprospecting. Antiproliferative activity. Fractionation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Características comumente adquiridas por grande parte dos cânceres.....	15
Figura 2 - Diversidade estrutural de produtos naturais bioativos isolados de actinomicetos marinhos .....	18
Figura 3 - Desenho experimental do presente trabalho mostrando todas as etapas em sequência temporal .....	21
Figura 4 - Cultura de BRA – 036 em meio A1 observada por meio de lupa .....	24
Figura 5 - Microrganismos isolados de extrato de <i>Palythoa caribaeorum</i> do ponto 1 da ilha de Fernando de Noronha .....	28
Figura 6 - Microrganismos isolados do extrato inicial de <i>Palythoa caribaeorum</i> do ponto 2 da ilha de Fernando de Noronha .....	29
Figura 7 - Microrganismos isolados do extrato inicial de <i>Palythoa caribaeorum</i> do ponto 3 da ilha de Fernando de Noronha .....	30
Figura 8 - Fotografia da placa de meio SCA, mostrando o aspecto do primeiro actinomiceto isolado em meio SCA, identificado como PCFN2 T SCA - A (A), e fotografia do mesmo microrganismo após repique em meio A1 (B) .....	31
Figura 9 - Fotografias do isolado PCFN2 TMA - A .....	32
Figura 10 - Fotografias de duas culturas de PCFN2 TMA- A, cultivado em meio A1.....	33
Figura 11 - Frações obtidas do extrato bruto da cepa BRA .....	35
Figura 12 - Cromatografia em camada delgada das frações obtidas do extrato bruto de BRA – 036 .....	36
Gráfico 1 - Inibição do crescimento (%) em células da linhagem HCT – 116 pelo extrato bruto e frações da cepa BRA – 036 e extratos brutos de BRA – 350 e 351 .....	37
Gráfico 2 - Curva logarítmica concentração-efeito do extrato bruto de BRA – 036. A CI50 obtida foi 4,28 ng/mL .....	38
Gráfico 3 - Curva de crescimento de BRA – 036 ao longo de 10 dias de cultivo. ....	39
Tabela 1 – Frações derivadas do extrato de BRA - 036 obtidas pelo uso de solventes puros ou misturas binárias em ordem crescente de polaridade .....	25

Tabela 2 – Caracterização dos actinomicetos isolados de <i>Palythoa caribaeorum</i> provenientes do arquipélago Fernando de Noronha depositados no banco de cepas do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia Marinha .....	34
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
FUNCAP	Fundação Cearense de Apoio à Pesquisa
RPMI	Meio Roswell Park Memorial Institute
MTT	Brometo de 3-(4,5-Dimetil-2-thiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio
HCT-116	Linhagem de tumor humano de colon (do inglês <i>Human Colon Tumor</i> )
PC3/M	Linhagem de câncer de próstata metastático (do inglês <i>Metastatic Prostate Cancer</i> )
NPDM	Núcleo de Pesquisa em Medicamentos
CI50	Concentração inibitória média

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	14
2. OBJETIVOS .....	19
2.1. GERAL: Estudar o potencial antitumoral de extratos e de frações obtidos de microrganismos associados ao zoantídeo <i>P. caribaeorum</i> e de um actinomiceto isolado de <i>P. variabilis</i> . .....	19
2.2. ESPECÍFICOS:.....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	20
3.1 Desenho experimental.....	20
3.2 Coleta.....	21
3.3 Processamento do material .....	21
3.4 Isolamento de microrganismos .....	22
3.5 Meios de cultura .....	22
3.6 BRA – 036 .....	23
3.7 Obtenção dos extratos brutos e fracionamento bioguiado .....	24
3.8 Relação do tempo de cultivo vs biomassa vs atividade antiproliferativa vs rendimento do extrato .....	25
3.9 Cultura celular .....	26
3.10 Potencial antitumoral - triagem inicial e curva concentração-efeito de amostras em células tumorais <i>in vitro</i> através do teste do MTT.....	26
3.11 Análise estatística.....	27
4. RESULTADOS .....	27
4.1 Isolamento de actinomicetos associados a <i>Palythoa caribaeorum</i> de Fernando de Noronha .....	27
4.2 Isolamento de actinomicetos provenientes do material submetido a tratamento térmico .....	30
4.3 Isolamento de actinomicetos provenientes do material não submetido a tratamento .....	31
4.4 Obtenção do extrato bruto de BRA – 036 e fracionamento por cromatografia em coluna.....	34
4.5 Triagem inicial e curva concentração-efeito do extrato bruto e frações de BRA – 036 - atividade antiproliferativa pelo Teste do MTT .....	36
4.6 Curva de crescimento de BRA – 036.....	37
5. DISCUSSÃO .....	40
5.1. Isolamento de actinomicetos provenientes do material submetido a tratamento térmico e não submetido a tratamento .....	40
5.2. Extrato bruto e frações obtidas do cultivo em pequena escala de BRA – 036 .....	43
5.3. Triagem inicial do extrato bruto e frações de BRA – 036 – atividade antiproliferativa pelo Teste do MTT .....	43
5.4. Curva de crescimento BRA – 036 .....	45
6. CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS.....	46

## 1. INTRODUÇÃO

A chamada “guerra contra o câncer” foi marcada pela assinatura do Ato Nacional do Câncer em 1971, pelo então presidente americano Richard Nixon (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2014). Desde então, o mundo tem intensificado a busca por formas de se prevenir, tratar e curar pessoas acometidas por essa moléstia, a qual é uma das principais causas de morte por doença no mundo (WHO, 2015). Esse problema, cujo nome designa na verdade um conjunto de mais de 100 doenças capazes de afetar qualquer célula do corpo, foi responsável por 8,2 milhões de mortes em 2012 e espera-se mais 21,4 milhões de novos casos para 2030 (GLOBOCAN IARC 2012, INCA 2015).

Apesar de ser uma doença extremamente complexa, cuja manifestação é muito variável, grande parte dos cânceres possuem um conjunto definido de características em comum ao se estabelecerem no paciente, a saber: 1) Auto-suficiência em sinais proliferativos; 2) Hiposensibilidade a supressores de crescimento; 3) Imortalidade replicativa; 4) Evasão à imunidade; 5) Resistência à morte celular; 6) Invasão e metástase; 7) Indução à angiogênese; 8) Reprogramação do metabolismo energético; 9) Inflamação promovida pelo tumor; 10) Instabilidade genômica e mutações (HANAHAN; WEINBERG, 2011)(Figura 1). Essas características são de suma importância não apenas para o desenvolvimento e estabelecimento do câncer mas também por servirem como base para o design de estratégias de combate à doença.

Dentre as diversas estratégias utilizadas no combate ao câncer tais como remoção cirúrgica e radioterapia, a quimioterapia se configura como a principal, a qual é também carro-chefe da pesquisa em oncologia. De acordo com uma extensa consulta às listas da *Food and Drug Administration* (FDA), bem como a outras bases de dados, entre 1981 e 2010, quase 80 % do agentes quimioterápicos aprovados para o tratamento do cancer é de origem natural, cuja maioria foi isolada de fontes clássicas tais como plantas e solos (NEWMAN; CRAGG, 2012). Entretanto, ainda que inúmeros e intensos esforços tenham sido empregados no combate ao câncer, nenhum fármaco é 100 % efetivo em todos os pacientes e o número de compostos que chegam a ser aprovados para uso clínico tende a diminuir. Assim, a busca por novas fontes com potencial anticâncer se faz ainda bastante necessária bem como imprescindível para o avanço da pesquisa oncológica e sua aplicação no tratamento do câncer.

Figura 1 - Características comumente adquiridas por grande parte dos cânceres



Fonte: Adaptado de Hanahan e Weinberg, 2011.

Uma fonte alternativa de produtos naturais que oferece grande potencial e tem recebido muita atenção nas últimas décadas compreende os ambientes marinhos. Tendo sido palco para o surgimento da vida, esses habitats ocupam mais de 2/3 da superfície terrestre e abrigam representantes de 35 dentre os 36 filos de animais atualmente descritos, sendo que 15 filos são exclusivamente marinhos (LEAL et al., 2012). Assim, esses ecossistemas estão entre os mais diversos de todo o planeta, tanto no que se refere à fauna de invertebrados quanto à diversidade microbiana. Considerando que esses ambientes possuem uma imensa riqueza filogenética a ser desvendada e que a biodiversidade está diretamente relacionada à diversidade genética e metabólica, os oceanos e mares figuram como uma fonte riquíssima de compostos bioativos, em sua maioria metabólitos secundários, com potencial farmacológico (LAM, 2006).

O potencial antitumoral dos ambientes marinhos começou a ser descoberto na década de 50, quando BERGMANN *et al.*, 1951, isolaram dois nucleosídeos da esponja *Tethya crypta* (*Cryptotethya crypta*), cujos análogos sintéticos ara-A e ara-C são até hoje utilizados no tratamento de infecções virais e leucemias, respectivamente (BERGMANN; FEENEY, 1951; COHEN, 1977; CANCER RESEARCH UK, 2015). As décadas seguintes foram extremamente promissoras para a pesquisa em produtos naturais marinhos (PNM), o



que se constata pelo fato de até dois anos atrás mais de 22.000 compostos dessa origem terem sido isolados e pelo aumento no interesse e utilização desses produtos pela indústria farmacêutica. Ainda, a taxa de sucesso em que uma droga proveniente de um ambiente marinho entra na prática clínica é cerca de seis vezes maior que a das provenientes de outras fontes (COSTA-LOTUFO et al., 2009; GERWICK; FENNER, 2013).

As fontes animais das quais os PNM podem ser prospectados são bastante variadas, compreendendo esponjas, cnidários, equinodermos, moluscos, briozoários, tunicados, dentre muitas outras (LEAL et al., 2012; RADJASA et al., 2011). No que se refere ao filo Cnidaria, um excelente exemplo que merece grande consideração é o da palitoxina, uma das toxinas mais poderosas até hoje descobertas e que foi isolada de diferentes espécies do zoantídeo do gênero *Palythoa* (MOORE; SCHEUER, 1971).

Os zoantídeos são invertebrados marinhos pertencentes à ordem Zoanthidae, filo Cnidaria, e possuem ampla distribuição nas zonas tropicais, habitando comumente recifes de coral (SILVA et al., 2015). Recentemente, esses animais tem recebido um enfoque maior da pesquisa em PNM por serem uma fonte promissora de diversos compostos com estruturas químicas novas e potenciais atividades biológicas. As espécies *Palythoa caribaeorum* e *P. variabilis*, por exemplo, produzem duas ceramidas sulfonadas pertencentes a uma nova classe de lipídios contendo enxofre (ALMEIDA et al., 2012). No que se refere a *P. caribaeorum*, SOUZA et al. (2008) identificaram uma proteína por ele produzida com atividade exoquitinolítica. No que concerne ao potencial anticâncer, as espécies do gênero *Palythoa* são também muito promissoras, considerando que alguns compostos por elas produzidos exercem efeitos pró-apoptóticos em linhagens tumorais (WILKE et al., 2010).

O potencial químico e farmacológico do gênero *Palythoa* bem como de demais invertebrados marinhos é grande e justificaria a prospecção desses organismos, não fosse a seguinte problemática. Apesar dos invertebrados marinhos serem por si só uma fonte rica e promissora de produtos naturais, existe um grande problema associado com sua utilização, que é a sustentabilidade. Para que sejam extraídas quantidades suficientes de PNM para os ensaios clínicos, é necessário que se colete uma quantidade imensa de animais, por vezes toneladas deles, o que geralmente inviabiliza o avanço da pesquisa com essas moléculas bioativas tanto do ponto de vista ambiental como ético (SCHAUFELBERGER et al., 1991). Ainda que se faça uso de técnicas em grande escala como a maricultura e aquicultura, essa problemática continua vigente na grande maioria dos casos. Nesse contexto, surge uma promissora e excitante solução: os microrganismos marinhos.

Inicialmente, acreditava-se que a vasta coleção de compostos com potencial farmacológico encontrados nos extratos orgânicos de invertebrados marinhos, cuja maioria compreende produtos do metabolismo secundário, eram produzidos pelos próprios animais. Entretanto, diversos estudos têm indicado que os metabólitos secundários são em sua maior parte produzidos pela microbiota associada a esses organismos (GERWICK; FENNER, 2013). Um dos melhores exemplos desse fato é o da molécula conhecida como Briostatina 1. Esse policetídeo, inicialmente isolado do briozoário *Bugula neritina*, é na verdade produzido pela bactéria simbiote *Candidatus Endobugula sertula* e possui grande potencial como quimioterápico (COSTA-LOTUFO et al., 2009; KOLLÁR et al., 2014; PLIMACK et al., 2014). Outro exemplo extraordinário, é o da molécula Salinosporamida A, uma  $\beta$ -lactona isolada de um actinomiceto marinho do gênero *Sanilispora*. Esse produto natural é um inibidor de proteassomo 20S e foi o mais rápido a entrar em testes clínicos para tratamento de mieloma múltiplo (FENICAL et al., 2009).

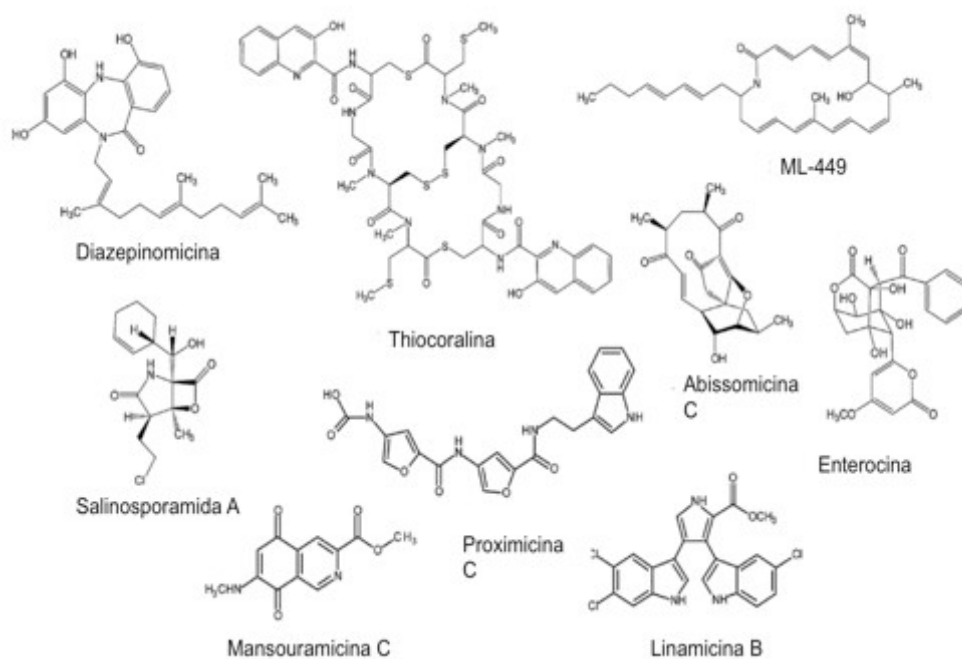
Além dos diversos exemplos recentes de substâncias isoladas de microrganismos associados a invertebrados marinhos, é importante lembrar que o conhecimento sobre a diversidade de produtos naturais produzidos por microrganismos não é novo. Grande parte dos compostos utilizados na clínica, incluindo o agente antituberculínico estreptomicina, foram isolados de microrganismos terrestres. Além disso, em alguns casos, uma única espécie de microrganismo pode possuir o potencial genético de produzir dezenas de compostos, o que demonstra ainda mais o potencial biotecnológico que esses seres microscópicos possuem (BOK et al., 2006; UDWARY et al., 2007). Assim, a prospecção de produtos naturais com estruturas químicas e potencial farmacológico inéditos por meio do cultivo de microrganismos marinhos é extremamente promissora, merecendo atenção e investimento da comunidade científica.

Além da potência elevada da estreptomicina e salinosporamida A acima citadas, esses produtos naturais possuem outra característica em comum: ambos são produzidos por um grupo particular de bactérias, os actinomicetos. Esses microrganismos são pertencentes à ordem Actinomycetales e caracterizam-se molecularmente por um conteúdo de GC aproximado de 70% (PROCÓPIO et al., 2012). Essas bactérias são encontradas abundantemente em diversos ambientes, tais como água doce, solos e sedimentos marinhos, e produzem compostos com estruturas químicas novas e atividades biológicas múltiplas (JENSEN et al., 2005). O potencial dos actinomicetos, particularmente de fontes terrestres, é conhecido de longa data. O gênero *Streptomyces*, um dos principais representantes desse grupo, é responsável pela produção de mais de 70% dos compostos bioativos isolados de

actinomicetos, tais como antibióticos, antitumorais, moléculas anti-inflamatórias, dentre outros (KRISHNAN; MANI; JASMINE, 2014; MOORE et al., 1999; TAN; MA, 2008; WATVE et al., 2001).

Entretanto, com o passar dos anos, o número de moléculas com estruturas novas isoladas por estudos com actinomicetos de ambientes terrestres diminuiu significativamente, o que, junto com o fato dos ambientes marinhos terem passado a ser mais explorados, fez com o que enfoque dessas pesquisas migrasse para os actinomicetos de ambientes marinhos. O potencial genético e biotecnológico que esses actinomicetos possuem é uma característica sem paralelo, tendo em vista a quantidade de moléculas com estruturas químicas novas que vêm sendo descobertas, muitas delas com atividade anticâncer (LAM, 2006; ZOTCHEV, 2012) (Figura 2).

Figura 2 - Diversidade estrutural de produtos naturais bioativos isolados de actinomicetos marinhos.



Fonte: Adaptado de Zotchev S.B., 2012.

Com 8.500 km de extensão e sendo o segundo mais extenso do mundo, o litoral brasileiro representa uma fonte promissora de PNM com potencial anticâncer (SELEGHIM et al., 2007). Com os trabalhos pioneiros iniciados pelo nosso grupo, inicialmente conduzido pela prof<sup>a</sup> Letícia Costa Lotufo, a costa cearense passou a ser vislumbrada como um local profícuo em espécies produtoras de moléculas bioativas, principalmente de compostos potencialmente antitumorais (ALMEIDA et al., 2012; FERREIRA et al., 2007; JIMENEZ et

al., 2003; WILKE et al., 2010). Dentre os organismos marinhos da costa cearense produtores desses compostos, estão espécies do gênero *Palythoa* (FERREIRA et al., 2007; SAHM, 2014; WILKE et al., 2010). Os estudos desenvolvidos pelo nosso grupo foram realizados em diversas praias do litoral cearense, como Fleixeiras (Trairi), Pedra Rachada (Paracuru), Taíba (São Gonçalo do Amarante) e Ponta Grossa (Icapuí) e fazem parte de um projeto maior de prospecção de invertebrados da costa brasileira e ilhas oceânicas.

Além de uma extensa zona costeira, o Brasil possui uma ampla área que engloba ilhas e seus arredores, os quais constituem parte considerável dos 3.500.000 km<sup>2</sup> de zona econômica exclusiva. Dentre essas ilhas, o arquipélago Fernando de Noronha é um dos principais conjuntos de ilhas da região Nordeste e possui uma grande importância econômica e ecológica. Entretanto, ainda não existem estudos que visem avaliar o potencial antitumoral da microbiota associado a zoantídeos habitantes desse arquipélago.

Assim, a hipótese para o presente trabalho foi que o zoantídeo *P. caribaeorum* e o *P. variabilis* estão associados a actinomicetos produtores de substâncias potencialmente antitumorais. Tendo em vista ambas as necessidades de se encontrar novas fontes de produtos naturais com potencial anticâncer e de contornar o problema da produção sustentável desses compostos, o presente trabalho foi conduzido com o objetivo de isolar actinomicetos associados ao zoantídeo *P. caribaeorum* e avaliar o potencial anticâncer desses microrganismos associados bem como o de outro actinomiceto isolado previamente de *P. variabilis*. Tal finalidade foi explorada utilizando-se técnicas de isolamento, extração e avaliação da atividade antiproliferativa contra células tumorais da linhagem de câncer colon-retal HCT-116. Os locais de coleta pertencem à região nordeste, sendo um o arquipélago Fernando de Noronha-PE e o outro a praia da Taíba no Ceará.

## **2. OBJETIVOS**

**2.1.GERAL: Estudar o potencial antitumoral de extratos e de frações obtidos de microrganismos associados ao zoantídeo *P. caribaeorum* e de um actinomiceto isolado de *P. variabilis*.**

### **2.2.ESPECÍFICOS:**

- Isolar actinomicetos associados ao zoantídeo *P. caribaeorum* de Fernando de Noronha.

- Avaliar o potencial antitumoral *in vitro* de extratos brutos de actinomicetos isolados de *P. caribaeorum* do arquipélago Fernando de Noronha.
- Avaliar o potencial antitumoral *in vitro* contra uma linhagem de câncer colôn-retal do extrato bruto e das frações obtidos das culturas de actinomiceto previamente isolado de *P. variabilis* da costa cearense.
- Determinar o tempo ótimo de cultivo para obtenção de extratos ativos da(s) linhagem(ns) produtoras de compostos com potencial antitumoral.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Desenho experimental

O presente trabalho seguiu o desenho experimental ilustrado na Figura 3. Exemplares de zoantídeos foram coletados, devidamente armazenados e conduzidos ao Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia Marinha. O processamento, plaqueamento e isolamento foi então realizado.

Os actinomicetos isolados foram cultivados em meio líquido e suas culturas foram extraídas com acetato de etila (AcOEt). Após a obtenção dos extratos brutos e seu fracionamento, buscou-se testar sua atividade antiproliferativa por meio do teste do MTT (Brometo de 3-(4,5-Dimetil-2-thiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio).

Figura 3 - Desenho experimental do presente trabalho mostrando todas as etapas em sequência temporal



Fonte: Elaborada pelo autor.

### 3.2 Coleta

A coleta de *P. caribaeorum* foi realizada manualmente no arquipélago Fernando de Noronha, em 3 diferentes pontos no Porto de Santo Antônio, tendo-se coletado diversos exemplares para cada ponto. Para preservação dos zoantídeos, o material coletado foi borrifado com etanol 70% para a descontaminação superficial, lavado em água do mar estéril e disposto em recipientes de tecido, os quais foram armazenados a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  em tubos de polipropileno contendo nitrogênio líquido.

### 3.3 Processamento do material

Exemplares individuais de zoantídeos para cada ponto de coleta foram processados em condições estéreis no Laboratório de Ecotoxicologia Marinha (ECOTOX) no Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) da Universidade Federal do Ceará e no LaBBMar, Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento em Medicamentos (NPDM). Os espécimes foram

macerados com auxílio de um cadinho e bastão estéreis até que formassem uma pasta homogênea e viscosa, devido aos muco produzido pelo animal.

### 3.4 Isolamento de microrganismos

Um alíquota de 100 uL dos zoantídeos macerados foi plaqueado para três diferentes meios de cultura, a saber, ágar amido-caseína (SCA), ágar minerais traços (TMA) e meio ágar-água do mar (SWA). Nos casos onde não se obteve nenhum actinomiceto, o macerado foi aquecido a 55°C por 5 minutos. A identificação das placas foi feita de acordo com o zoantídeo coletado, o ponto e local de coleta utilizando as iniciais da espécie coletada e do local de coleta, enquanto que a identificação de colônias de diferentes morfologias foi realizada por meio de letras do alfabeto (por exemplo, PCFN1 TMA - A, que significa *Palythoa caribaeorum* Fernando de Noronha Ponto 1 meio de cultura TMA colônia A). Caso tenha o tratamento térmico tenha sido utilizado, adicionou-se a letra T após o número do ponto de coleta. O crescimento microbiano foi observado ao longo de até 8 semanas e, ao se observar crescimento característico de actinomicetos, repicou-se essas colônias para meio A1. O material extra proveniente dos pontos foi coletado em tubos *ependorf*, diluído com água do mar e glicerol na proporção 1:1 e armazenado a -80°C.

### 3.5 Meios de cultura

A composição dos meios de cultura foi:

- SWA (água do mar ágar, do inglês, *Sea Water Agar*): 16 g ágar; 1 L de água do mar filtrada e diluída em 75% de dH<sub>2</sub>O.
- SCA (ágar amido-caseína, do inglês, *Starch Casein Agar*): 16 g ágar; 63 g meio pronto e desidratado (HiMEDIA Laboratories; 1 L dH<sub>2</sub>O).
- TMA (ágar minerais-traço, do inglês, *Trace Mineral Agar*): 16 g ágar; 0,1 g glucose; 0,1 g extrato de levedura; 0,5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,7 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,1 g KNO<sub>3</sub>; 0,3 g NaCl; 0,1 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,02 g CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 200 mg FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 180 mg ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 20 mg MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O; 90 mg CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O; 100 mg CaSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 200 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 5 mg (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>MO<sub>7</sub>O<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O; 1 L dH<sub>2</sub>O.
- A1 sólido: 16 g ágar; 10 g amido solúvel; 4 g extrato de levedura; 2 g peptona; 1 L de água do mar filtrada e diluída em 75% de dH<sub>2</sub>O.

- A1: 10 g amido solúvel; 4 g extrato de levedura; 2 g peptona; 1 L de água do mar filtrada e diluída em 75% de dH<sub>2</sub>O.
- A1 turbinado: 10 g amido solúvel; 4 g extrato de levedura; 2 g peptona; 400 mg CaCO<sub>3</sub>; 5 mL KBr; 5 mL Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>; 1 L de água do mar filtrada e diluída em 75% de dH<sub>2</sub>O.

Todos os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 30 minutos. Os que continham ágar foram suplementados com ciclohexamida (Sigma) 150 µg/mL para evitar o crescimento de fungos.

### **3.6 BRA – 036**

A cepa de actinomiceto BRA – 036 utilizada no presente estudo, foi previamente isolada por Sahn *et al* (2014) do zoantídeo *P. variabilis*, proveniente da praia da Taíba. Essa bactéria, a qual estava armazenada a -70 °C, foi descongelada, reativada em 50 mL de meio A1 e plaqueada ou inoculada para meio A1 sólido (Figura 4). Estudos prévios com 50 µg/mL do extrato bruto dessa cepa mostraram atividade antiproliferativa próxima a 60% na linhagem de câncer de próstata metastático PC-3/M (SAHM, 2014).



Figura 4 – Cultura de BRA – 036 em meio A1 observada por meio de lupa. Atentar para os aglomerados de esporos visíveis na forma de halos brancos



Fonte: Foto do autor.

### 3.7 Obtenção dos extratos brutos e fracionamento bioguiado

A cepa BRA-036 foi crescida a temperatura ambiente em 1 L de meio A1 turbinado sob agitação a 200 rpm por 6 dias a um inóculo de 10% v/v. Transcorrido esse período, 800 mL de AcOEt foram adicionados à cultura, deixando-a sob extração por 2 horas. A partição líquido-líquido foi feita em funil de separação, logo em seguida. Nos casos onde houve formação de emulsão, foi adicionado solução salina concentrada para rompimento da emulsão e recuperação da fase orgânica, tendo esta sido tratada com sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) e destilada em rotaevaporador. Por fim, recuperou-se o extrato bruto denominando-o de BRA-036A ( $m = 62,4$  mg), do qual retirou-se um alíquota de 1mg para triagem inicial por meio do ensaio de MTT.

O extrato bruto foi fracionado por cromatografia em coluna, utilizando-se 40,0 g de sílica gel e um pequeno volume de n-hexano para condicionamento da matriz (fase estacionária). O material total foi homogeneizado em 0,5g de sílica gel e disposto na coluna, realizando-se seu fracionamento por meio de solventes puros ou misturas binárias em ordem crescente de polaridade conforme mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 – Frações derivadas do extrato de BRA - 036 obtidas pelo uso de solventes puros ou misturas binárias em ordem crescente de polaridade

Sigla	Eluente	Volume de eluente (mL)
<b>BRA - 036-AA</b>	Hex 100%	60
<b>BRA - 036-AB</b>	Hex/AcOEt 2:1	60
<b>BRA - 036-AC</b>	Hex/AcOEt 1:1	60
<b>BRA - 036-AD</b>	AcOEt 100%	60
<b>BRA - 036-AE</b>	AcOEt/MeOH 2:1	60
<b>BRA - 036-AF</b>	AcOEt/MeOH 1:1	60
<b>BRA - 036-AG</b>	MeOH 100%	60

Fonte: Elaborada pelo autor.

Amostras de cada fração foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD). Essa técnica de cromatografia planar utiliza um material sólido como fase estacionária, normalmente sílica-gel, e uma fase móvel líquida, na qual as amostras são eluídas (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998). Para uma das placas cromatográficas empregadas, utilizou-se uma mistura de solventes mais apolares Hex/AcOEt (8:2) como eluente ou fase móvel, enquanto para as outras fez-se uso de solventes mais polares, a saber, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (9:1). Para a placa cromatográfica com eluentes mais apolares, utilizou-se o revelador vanilina, enquanto para as outras duas utilizou-se tanto a vanilina como o reagente de Ehrlich (*p*-dimetilaminobenzaldeído).

### **3.8 Relação do tempo de cultivo vs biomassa vs atividade antiproliferativa vs rendimento do extrato**

Com o intuito de otimizar o cultivo para obter um extrato mais potente, realizou-se um estudo de crescimento cinético com a cepa BRA-036 durante 10 dias. A extração das culturas foi feita a cada 2 dias, com 3 replicatas. Essa bactéria foi inoculada a 10% em 18 erlenmeyers contendo 250 mL de meio A1 turbinado cada e foram mantidas em agitador a 270 rpm. Para a obtenção dos extratos brutos, adicionou-se acetato de etila (1:1) por 2 horas sob agitação a 240 rpm e realizou-se os procedimentos de separação da fase orgânica e da biomassa. Os frascos foram devidamente identificados de acordo com o dias nos quais a extração seria feita, a saber, P 0.1, P 0.2, P 0.3, P 1.1, P 1.2, P 1.3 e assim por diante. Para determinação do peso seco da biomassa em cada intervalo de tempo, o volume da biomassa foi filtrado a vácuo, seco em estufa a 100 °C e pesado em balança analítica de precisão.

Juntamente com a determinação da biomassa, foi feita a análise da atividade citotóxica dos extratos obtidos para cada dia, em células da linhagem tumoral HCT-116 através do ensaio do MTT, descrito no item 7 mais adiante.

### **3.9 Cultura celular**

Células da linhagem HCT – 116 foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro e cultivadas em recipientes de plástico para culturas (Corning, 25 cm<sup>2</sup>, volume de 50 mL), contendo 5 mL de meio de cultura RPMI 1640 (Gibco) suplementado com soro fetal bovino (10%). A passagem das células para novos recipientes com novo meio RPMI 1640 foi feita a cada 3 dias, utilizando-se 1mL de Tripsina 1X para soltura das células. As culturas foram mantidas em incubadora a 37 °C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

### **3.10 Potencial antitumoral - triagem inicial e curva concentração-efeito de amostras em células tumorais *in vitro* através do teste do MTT**

Células de linhagem HCT – 116 foram transferidas para uma placa de 96 poços a um inóculo de  $5 \times 10^4$  células/mL. Após as células terem aderido por 24 hs, as amostras de extratos ou frações foram diluídas em DMSO e testadas nas concentrações finais de 50 µg/mL e 5 µg/mL, por 72 hs, para triagem inicial do potencial antiproliferativo. No caso do experimento de curva concentração-efeito, as concentrações utilizadas foram 0,016, 0,08, 0,4, 2, 10 e 50 µg/mL, exceto para as curvas referentes aos pontos da curva de crescimento de BRA – 036, nas quais se utilizou as concentrações 0,005, 0,05, 0,5, 5 e 50 µg/mL. Como controle positivo utilizou-se o fármaco doxorubicina. Após 72 hs de incubação a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, 150 µL de solução de MTT 10% foram adicionados aos poços, deixando a placa incubando por mais 3 horas. Após esse período, o MTT convertido foi solubilizado adicionando-se 150 µL de DMSO e a leitura da absorbância no comprimento de onda 565 nm foi feita em espectrofotômetro.

Esse teste foi realizado para mensurar a atividade antiproliferativa dos extratos e das frações obtidas. O MTT é o sal de tetrazólio amplamente utilizado para se medir a atividade metabólica de células tumorais (ALLEY et al., 1988; MOSMANN, 1983). A maneira como esse ensaio funciona baseia-se na produção de FADH and NADH que ocorre durante o metabolismo celular. Quando essas coenzimas reduzem o MTT, elas o convertem a um composto insolúvel chamado Formazan. Após esse composto ser solubilizado em DMSO,

sua coloração púrpura, a qual pode ter sua intensidade medida por espectrometria. Através de uma curva padrão pode-se então calcular o quanto de MTT foi reduzido e conseqüentemente o quanto de atividade enzimática ocorreu durante o ensaio (RISS et al., 2004).

### **3.11 Análise estatística**

Os percentuais de inibição, curva concentração-efeito e curva biomassa vs atividade proliferativa vs tempo de cultivo foram calculados com auxílio do software GraphPad Prism 6, adotando-se um nível de significância de 5%

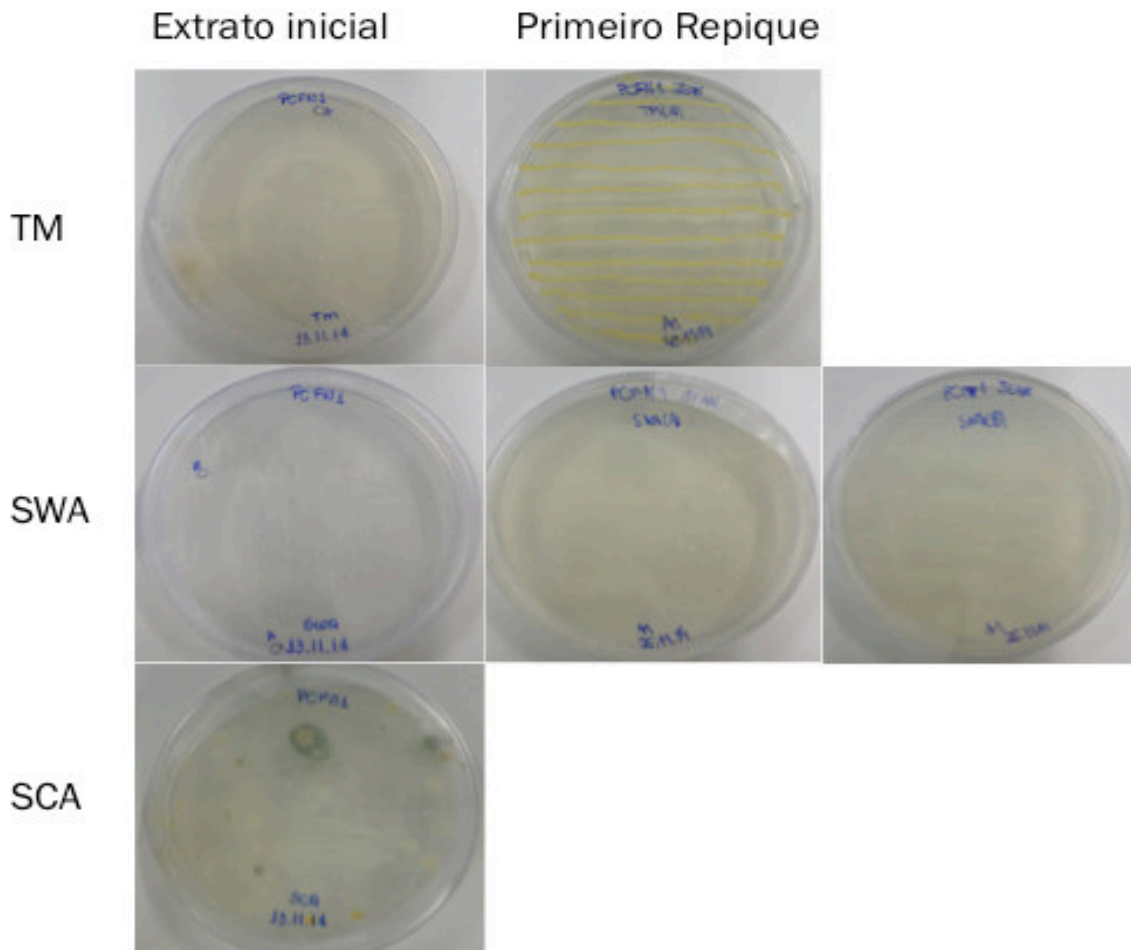
## **4 RESULTADOS**

### **4.1 Isolamento de actinomicetos associados a *Palythoa caribaeorum* de Fernando de Noronha**

Com uma semana após o plaqueamento em meios TMA, SCA e SWA, foi observado crescimento microbiano principalmente no meio SCA. Interessantemente, as bactérias que inicialmente foram obtidas nesse meio não apresentaram um crescimento tão rápido quando mais tarde repicadas para meio A1 + ciclohexamida, um padrão inverso às que não cresceram inicialmente nos meios SWA e TMA mas que cresceram rapidamente em meio A1 + ciclohexamida.

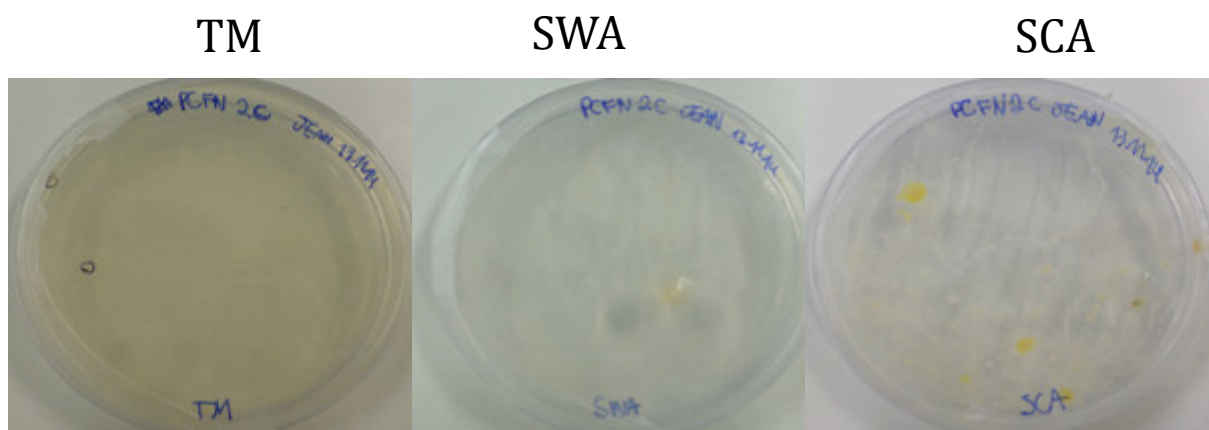
Após 12 dias de crescimento, 7 bactérias foram repicadas para meio A1 + ciclohexamida na tentativa de isolá-las e no dia 14, seu crescimento foi analisado (Figuras 5, 6 e 7).

Figura 5 – Microrganismos isolados de extrato de *Palythoa caribaeorum* do ponto 1 da ilha de Fernando de Noronha. O primeiro repique para meio A1 + ciclohexamida foi realizado 12 dias após o isolamento inicial nos meios TM, SWA e SCA.



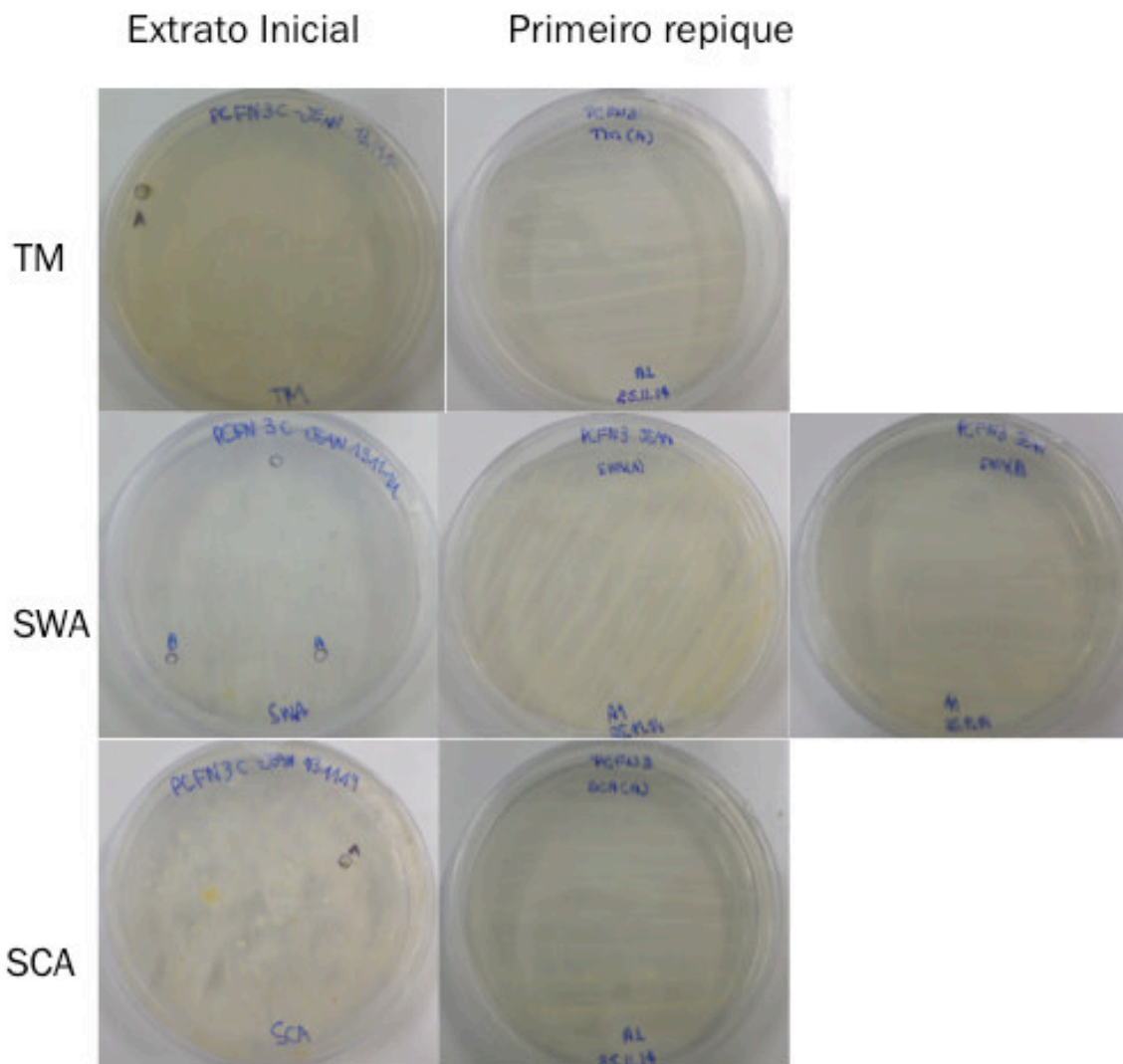
Fonte: Foto do autor.

Figura 6 – Microrganismos isolados do extrato inicial de *Palythoa caribaeorum* do ponto 2 da ilha de Fernando de Noronha.



Fonte: Foto do autor.

Figura 7 – Microrganismos isolados do extrato inicial de *Palythoa caribaeorum* do ponto 3 da ilha de Fernando de Noronha. O primeiro repique para meio A1 + ciclohexamida foi realizado 12 dias após o isolamento inicial nos meios TM, SWA e SCA.



Fonte: Foto do autor.

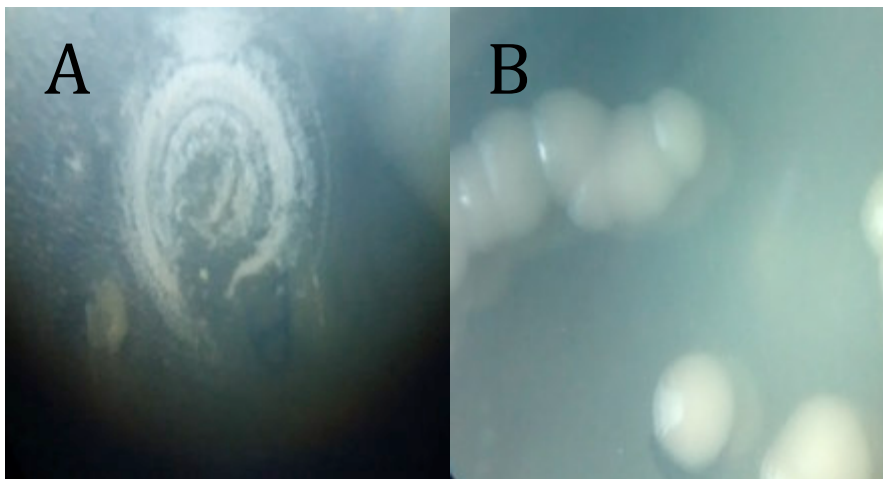
Por conta da falta de sucesso em se isolar actinomicetos, realizou-se um segundo processamento do material, dessa vez submetendo-o a tratamento térmico.

#### 4.2 Isolamento de actinomicetos provenientes do material submetido a tratamento térmico

Após 10 dias de crescimento em meio sólido, observou-se o surgimento de uma colônia em meio SCA com morfologia característica de actinomiceto, a saber textura seca e aspecto não brilhoso, proveniente do ponto 2 T. A cepa foi então repicada para meio sólido

A1 e seu crescimento observado ao longo dos dias. Após o repique para esse novo meio, observou-se que o actinomiceto possuía uma morfologia diferente da observada na placa primária após o mesmo período de crescimento (Figura 8).

Figura 8 – Fotografia da placa de meio SCA, mostrando o aspecto do primeiro actinomiceto isolado em meio SCA, identificado como PCFN2 T SCA- A,, e fotografia do mesmo microrganismo após repique em meio A1 (B).



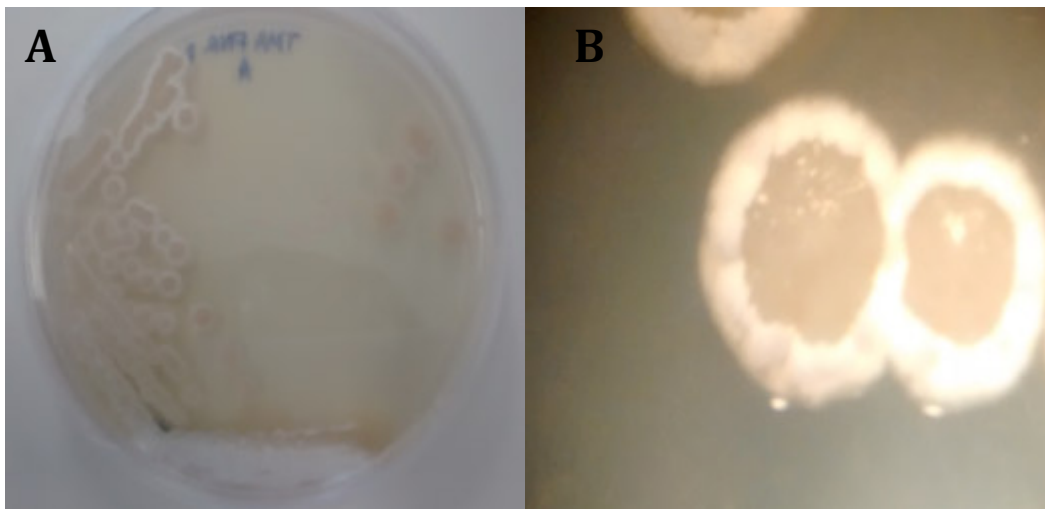
Fonte: Foto do autor.

#### **4.3 Isolamento de actinomicetos provenientes do material não submetido a tratamento**

Após 10 dias de crescimento em meio sólido, observou-se o surgimento de uma colônia em meio TMA de tamanho bem pequeno, ligeiramente semelhante a um actinomiceto, proveniente do ponto 2 não submetido a tratamento. O repique para meio A1 em placa e a observação do crescimento após 5 dias confirmou claramente o caráter de actinomiceto da cepa isolada (Figura 9).



Figura 9 – Fotografias do isolado PCFN2 TMA - A. (A) Fotografia da placa de petri evidenciando o crescimento do actinomiceto, que já se encontrava em fase de esporulação, evidenciada pela borda branca das colônias. (B) Visualização das colônias por meio de lupa

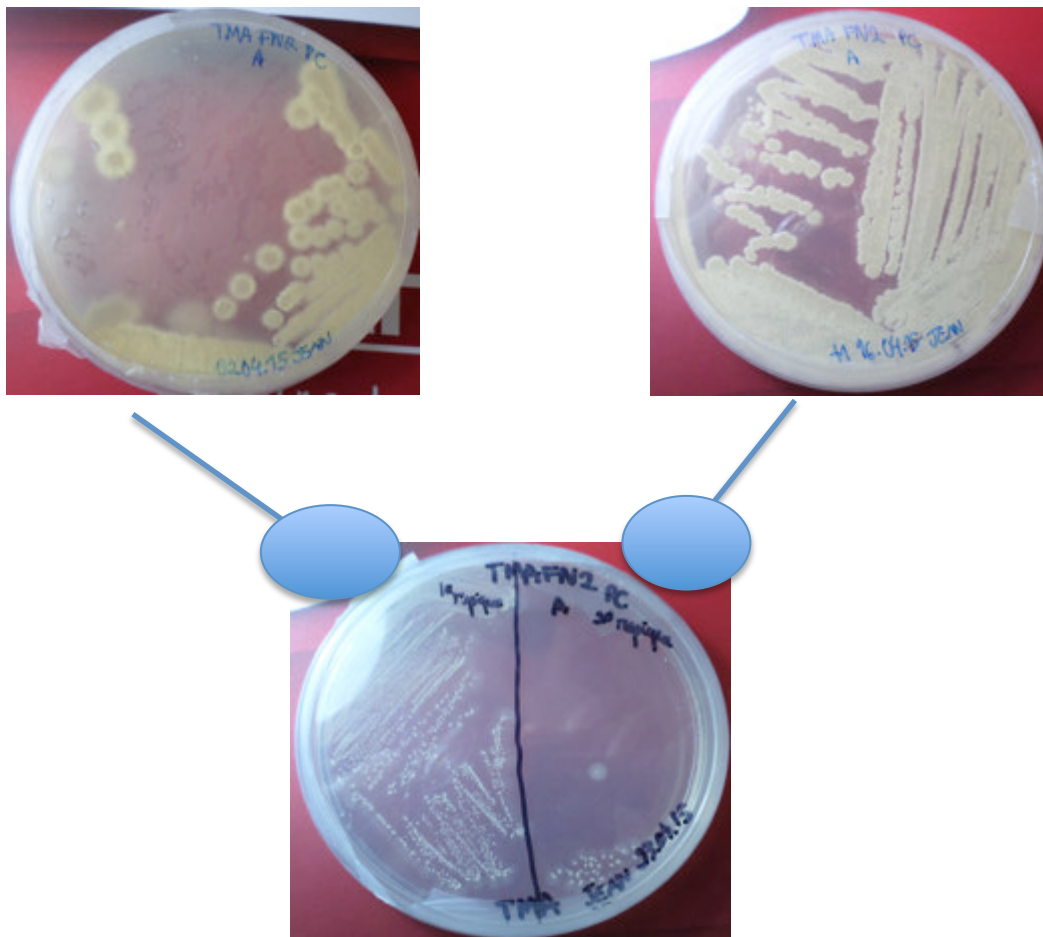


Fonte: Foto do autor.

Entretanto, assim como observado para o PCFN2 T SCA - A, o exemplar isolado em meio TMA apresentou morfologia diferente quando crescido e repicado para meio A1 em placa. Para testar se a diferença morfológica era dependente do meio de cultivo, realizou-se um novo repique para meio TMA, o mesmo meio no qual o actinomiceto havia sido originalmente isolado. Esse repique foi feito utilizando-se como inóculo dois repiques anteriores desse actinomiceto em meio A1, um mais antigo e outro 14 dias mais recente. A mudança no aspecto morfológico das colônias foi novamente observada (Figura 10).

Apesar da mudança na morfologia dos actinomicetos associados a *Palythoa caribaeorum* ter sido observada, a descrição morfológica desses isolados foi padronizada para a presente no meio A1 com pelo menos duas semanas após o repique e essas bactérias foram depositadas no banco de cepas do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia Marinha como mostrado na Tabela 2.

Figura 10 – Fotografias de duas culturas de PCFN2 TMA- A, cultivado em meio A1. As culturas foram repicadas para meio TMA, crescendo em colônias esbranquiçadas e menores.



Fonte: Foto do autor.

Tabela 2 – Caracterização dos actinomicetos isolados de *Palythoa caribaeorum* provenientes do arquipélago Fernando de Noronha depositados no banco de cepas do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia Marinha

Identificação	Meio de Origem	Método de Isolamento	Morfologia e observações
BRA – 350	TMA	Plaqueamento direto	Actinomiceto; Circular; centro bege-alaranjado rodeado por halo de esporos brancos
BRA – 351	SCA	Tratamento térmico	Actinomiceto; Circular; Cor leitosa; Pode demorar a esporular

Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 4.4 Obtenção do extrato bruto de BRA – 036 e fracionamento por cromatografia em coluna

A massa do extrato bruto obtido do cultivo em 1 L de meio A1 turbinado foi 62,4 mg, da qual retirou-se 1mg para diluição e triagem inicial por meio do teste MTT.

Objetivando obter frações do extrato bruto de BRA – 036 para avaliar a presença de classes gerais de moléculas bem como suas potenciais atividades antiproliferativas, realizou-se um fracionamento cromatográfica, utilizando-se uma coluna de sílica e um conjunto de 7 misturas de diferentes solventes como fase móvel (Figura 11). Interessantemente, a observação das diferentes frações mostrou que a fração A/M 2:1, identificada como BRA – 036AE, apresentou coloração mais amarelada.

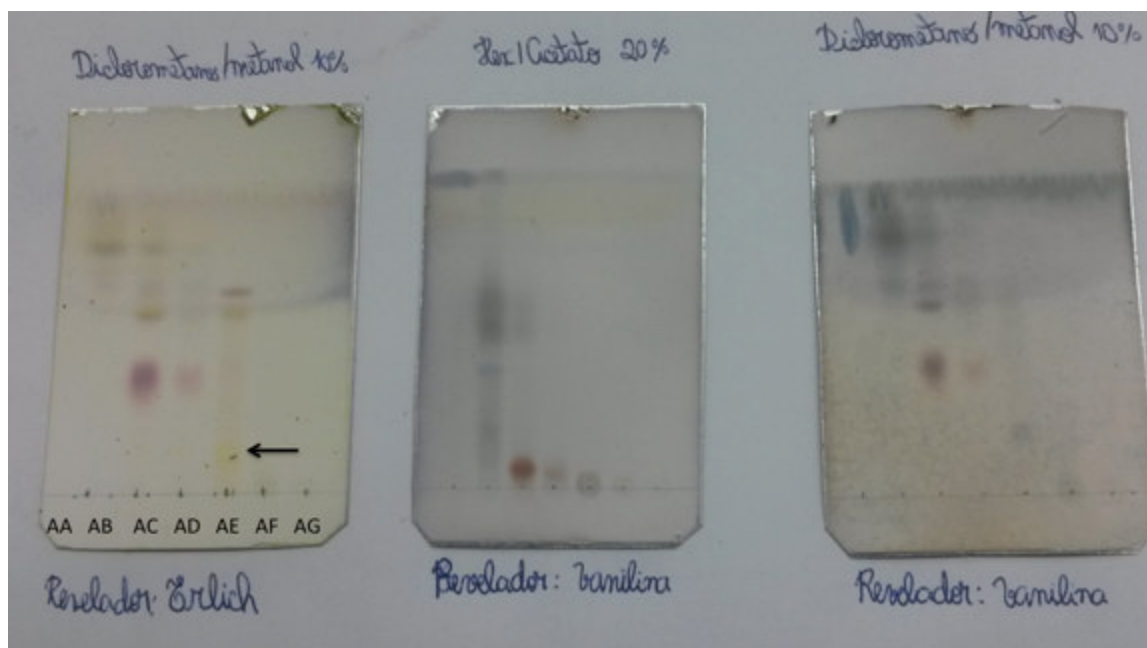
Figura 11 – Frações obtidas do extrato bruto da cepa BRA – 036. H - hexano; H/A 2:1 - hexano/acetato de etila 2:1; H/A 1:1 - hexano/acetato de etila; A - acetato de etila; A/M 2:1 - acetato de etila/metanol 2:1; A/M 1:1 - acetato de etila/metanol 1:1; M - metanol. Atentar para a coloração mais amarelada da fração A/M 2:1.



Fonte: Foto do autor.

A solução de Ehrlich utilizada como revelador em uma das placas cromatográficas revelou a presença de compostos indólicos, possivelmente dicetopiperazinas, evidenciados pela mancha amarela na parte inferior da placa (Figura 12). Essa mancha esteve presente na amostra AE, a qual foi obtida pela mistura de solventes AcOEt/MeOH 2:1.

Figura 12 – Cromatografia em camada delgada das frações obtidas do extrato bruto de BRA – 036, apresentadas em ordem crescente de polaridade e identificadas como AA, AB, AC, AD, AE, AF e AG. A seta preta aponta para a mancha amarelada, a qual é um possível indicativo da presença de dicetopiperazinas.

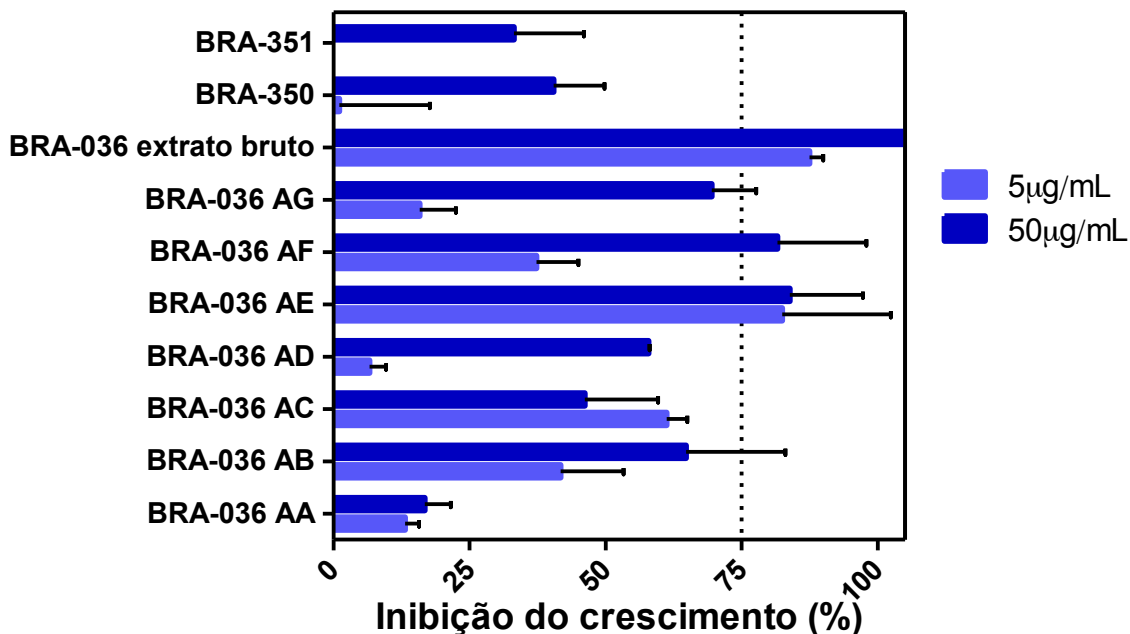


Fonte: Foto do autor.

#### 4.5 Triagem inicial e curva concentração-efeito do extrato bruto e frações de BRA – 036 - atividade antiproliferativa pelo Teste do MTT

A triagem inicial para avaliação da atividade antiproliferativa do extrato bruto e de suas frações foi feita utilizando-se o teste do MTT. A inibição do crescimento de células da linhagem HCT – 116 pelo extrato bruto foi 87,43 % para a menor concentração e 100 % para a maior ( $P < 0,05$ ) (Gráfico 1). Dentre as frações obtidas, a fração BRA-036 AE apresentou maior atividade antiproliferativa (83 %), porém sem diferença significativa entre as duas concentrações ( $P > 0,05$ ) (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Inibição do crescimento (%) em células da linhagem HCT – 116 pelo extrato bruto e frações da cepa BRA – 036 e extratos brutos de BRA – 350 e 351 . Barras pretas representam o desvio padrão. N = 3 para o extrato bruto de BRA – 036 e N = 2 para as demais amostras. Adotou-se um nível de significância de 5 %



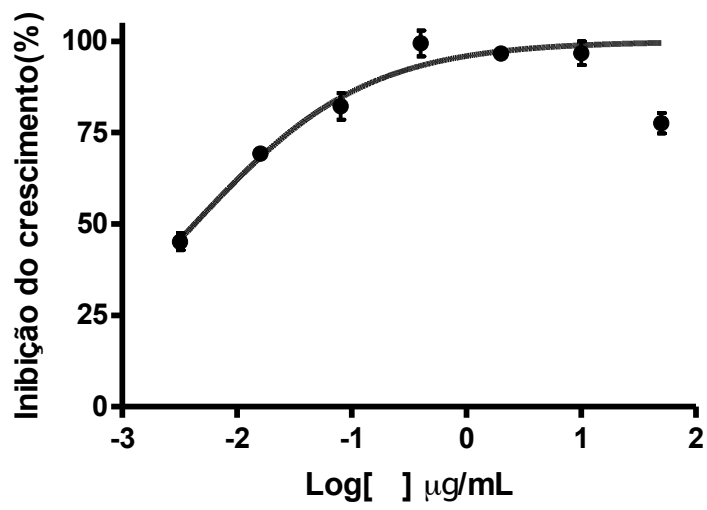
Fonte: Elaborada pelo autor.

Com a finalidade de se obter a concentração que inibe 50 % (CI50) da proliferação celular, uma curva concentração-efeito do extrato bruto de BRA – 036 foi elaborada. O valor para a CI50 obtida foi 4,28 ng/mL (Gráfico 2).

#### 4.6 Curva de crescimento de BRA – 036

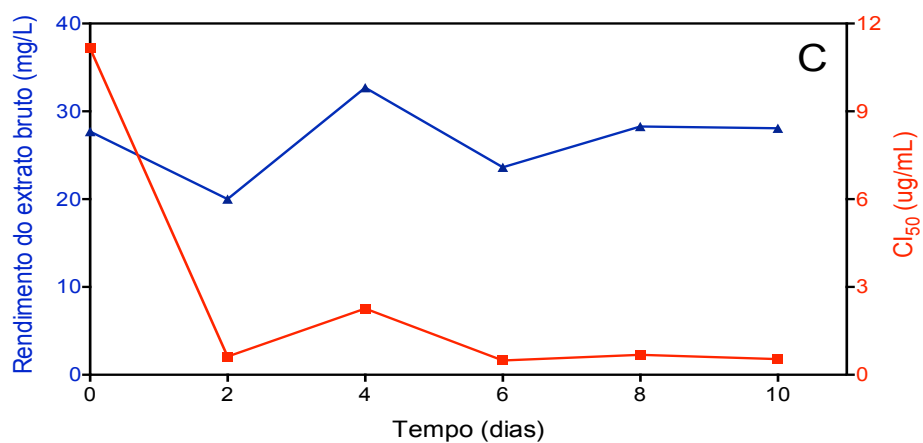
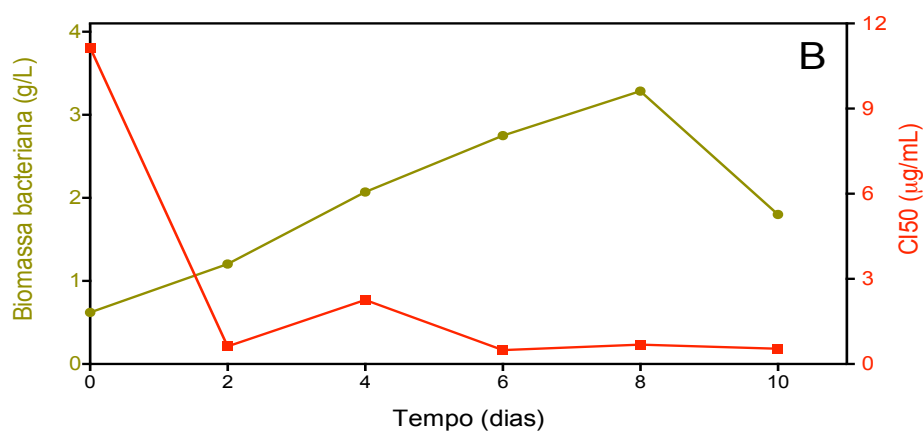
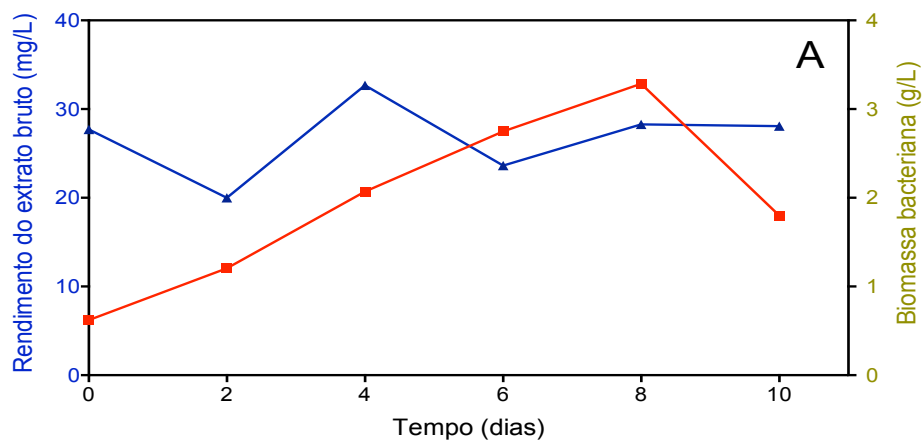
Uma curva de crescimento para avaliar a relação biomassa vs atividade proliferativa (CI50) vs tempo de cultivo foi montada para a cultura em larga escala de BRA – 036 ao longo de 10 dias (Gráfico 3).

Gráfico 2 – Curva concentração-efeito do extrato bruto de BRA – 036. A CI50 obtida foi 4,28 ng/mL



Fonte: Elaborada pelo autor.

Gráfico 3 - Curva de crescimento de BRA – 036 ao longo de 10 dias de cultivo.. A- Rendimento extrato bruto (em azul) vs biomassa (em verde musgo). B- Biomassa (em verde musgo) vs CI50 (em vermelho). C- Rendimento extrato bruto (em azul) vs CI50 (em vermelho).



Fonte: Elaborada pelo autor.



## 5. DISCUSSÃO

Visando a prospecção de produtos naturais marinhos com potencial anticâncer, o presente trabalho se propôs a isolar e cultivar actinomicetos associados ao zoantídeo *Palythoa caribaeorum*, bem como realizar a fracionamento bioguiado do extrato e determinação do tempo de cultivo mais adequado para produção de substâncias antiproliferativas de uma linhagem previamente isolada de *Palythoa variabilis*, a saber, BRA – 036. Para cumprir tais objetivos, realizou-se coletas desse invertebrado em Fernando de Noronha, tendo-se processado o material e utilizado técnicas de isolamento e cultivo. Após o cultivo da cepa BRA – 036 e extração com AcOEt, o extrato bruto foi fracionado, testando-se o potencial antiproliferativo deste e de suas frações pelo teste do MTT. Adicionalmente, avaliou-se o tempo ideal de cultivo para obtenção de um extrato mais ativo.

### 5.1. Isolamento de actinomicetos provenientes do material submetido a tratamento térmico e não submetido a tratamento

A utilização de tratamento térmico na segunda tentativa de isolamento de actinomicetos foi adotada para evitar o crescimento de bactérias gram-negativas. A inibição de seu crescimento pelo calor baseia-se na estrutura da parede celular, a qual possui uma fina camada de peptidoglicano, ao contrário de bactérias gram-positivas como os actinomicetos. Assim, a parede celular de bactérias gram-negativas possui uma menor resistência, tornando-as mais susceptíveis ao calor (MADIGAN et al., 2010).

Entretanto, o uso dessa estratégia não afetou o número de actinomicetos isolados no presente estudo. A baixa riqueza de actinomicetos associados a *Palythoa caribaeorum* foi também reportada em outro trabalho, no qual foram encontrados apenas 6 isolados pertencentes ao grupo Actinobacteria (CAMPOS, 2011). Ainda com a utilização de técnicas mais precisas para identificação de actinomicetos que as morfológicas, como o sequenciamento do gene codificante para o rRNA 16S, a riqueza encontrada é também bastante baixa. Dos 488 isolados bacterianos sequenciados para o rRNA 16S e obtidos do muco dos cnidários *Mussismilia hispida*, *Palythoa caribaeorum*, *Palythoa variabilis* e *Zoanthus solanderi*, apenas 1 % pertencia à classe Actinobacteria, o que suporta os resultados obtidos no estudo aqui apresentado (TONON, 2010). Ainda, o número de actinomicetos obtidos por técnicas dependentes de cultivo que estão associados a outras fontes tende a ser maior. No caso das esponjas *Suberites carnosus* e *Leucosolenia* sp., por exemplo, o

percentual de isolados pertencentes ao filo Actinobacteria é de 11 e 5 %, respectivamente (FLEMER et al., 2012). No estudo de Li e Liu, (2006), o número de actinomicetos isolados chegou a ser 23 para a esponja *Craniella austrialiensis*. Para o subfilo Urochordata, o número de unidades taxonômicas passa a ser ainda maior, como no caso da ascídia *Eudistoma toealensis*, na qual foram encontradas milhares de sequências correspondentes a actinobactérias (STEINERT; TAYLOR; SCHUPP, 2015).

Além da diferença de riqueza microbiana entre grupos de invertebrados, a riqueza de actinomicetos isolados desses animais é bem menor quando comparada à dos associados a sedimentos. No trabalho de Duncan et al. (2014a) foram isolados 466 actinomicetos associados a sedimentos marinhos, a maioria dos quais foram obtidos através do pré-tratamento “seco/carimbo” (45 %), comparado com método “diluição/calor” (30 %) e “plaqueamento direto” (25 %). Em outro trabalho dos mesmos autores, publicado no mesmo ano, o método de diluição/calor foi o menos eficaz de todos, indicando que a eficácia dos métodos de isolamento depende do local de coleta e que deve ser sofrer adequação de acordo com cada local e material coletado (DUNCAN et al., 2014b).

É importante salientar que o cultivo de microrganismos marinhos é por si só um grande desafio, considerando que apenas 1 % desses microrganismos é prontamente cultivável por métodos convencionais (BÉRDY, 2005). No que diz respeito aos actinomicetos, essa limitação na recuperação dessas bactérias também ocorre, como mostrado, por exemplo, no estudo de Steinert, Taylor e Schupp (2015), no qual foram encontradas mais de 6.000 sequências codificantes para rRNA 16S pelo método de pirosequenciamento.

Tendo em vista os aspectos acima citados, algumas hipóteses foram sugeridas para explicar a baixa riqueza encontrada para esse grupo no material proveniente de Fernando de Noronha: 1) A riqueza de actinomicetos associados ao zoantídeo *P. caribaeorum* é realmente baixa quando comparada à proveniente de outras fontes e provavelmente influenciada por aspectos ambientais e ecológicos ainda a serem elucidados. 2) As técnicas de amostragem e armazenagem utilizadas no presente trabalho não foram suficientemente eficazes tanto para coletar uma amostra representativa da população de *P. caribaeorum*, a qual seria mais rica do que mostrado neste estudo, como para preservar a riqueza de Actinomycetales presente nesses invertebrados marinhos. 3) As técnicas de isolamento utilizadas, apesar de bastante efetivas em isolar actinomicetos provenientes de outros ambientes, como sedimentos marinhos ou outros invertebrados, não foram suficientes para mostrar a real riqueza desses microrganismos advindos de Fernando de Noronha (DUNCAN et al., 2014a). Assumindo a veracidade desta

hipótese, seria de se esperar que os actinomicetos associados aos zoantídeos de Fernando de Noronha possuam demandas nutricionais mais requintadas que as dos actinomicetos isolados de outros ambientes ou fontes.

De forma a tentar melhorar o acesso à real riqueza e diversidade de actinomicetos associados aos zoantídeos *Palythoa caribaeorum* e *Palythoa variabilis*, a utilização de técnicas independentes de cultivo, bem como de técnicas de cultivo mais sofisticadas se torna bastante recomendada. Inspirados por essa necessidade de melhora na recuperação desses microrganismos, Jung et al. (2014) desenvolveram um dispositivo de cultivo *in situ* chamado I-tip, que permite a troca de nutrientes de forma mais eficiente bem como a melhor interação entre os diversos microbiontes presentes no ambiente. O emprego dessa nova tecnologia foi um sucesso, permitindo a esses pesquisadores melhorar a recuperação da microbiota associada a esponjas. Assim, a criação e emprego de novos métodos de cultivo em conjunto com a utilização de ferramentas moleculares para acessar a diversidade de actinomicetos marinhos figura-se como uma estratégia atraente e promissora.

Um dos aspectos marcantes observados para as culturas em placa dos actinomicetos isolados do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* proveniente de Fernando de Noronha foi a variação da morfologia colonial quando cultivados em meios diferentes (Figura 8 e Figura 10). Esse fenômeno não foi exclusivo para os actinomicetos, tendo se estendido também para alguns outros isolados gram-negativos. A capacidade de alterar a morfologia celular em resposta a estresses ambientais, competição e mudanças nas condições de cultivo é uma característica bem documentada no mundo microbiano e permite o sucesso adaptativo desses organismos a essas intempéries (JUSTICE et al., 2008; SHI; XIA, 2003). Estudos realizados com *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 mostraram que o cultivo em diferentes meios sólidos influenciou na morfologia colonial dessa bactéria. Ainda mais surpreendente foi o fato de, ainda nesse estudo, a quantidade de meio sólido na placa de Petri ter impactado a morfologia das colônias (SOUSA et al., 2013).

Como evidenciado no presente trabalho, a morfologia colonial das culturas de actinomicetos marinhos em meio sólido também varia a depender do meio de cultivo. Considerando a influência que as condições de cultivo, quantidade e tipo de meio utilizados têm sobre o aspecto das colônias bacterianas, a observação criteriosa e a longo prazo dessas culturas na rotina laboratorial torna-se bastante recomendada (PINE; HOWELL; WATSON, 1960; SOUSA et al., 2013).

## 5.2. Extrato bruto e frações obtidas do cultivo em pequena escala de BRA – 036

A coloração amarelada apresentada pela fração AE utilizando os solventes AcOEt/MeOH foi um aspecto marcante e é um provável reflexo das diferenças nos perfis de moléculas extraídas pelas misturas dos solventes. Considerando que o AcOEt é um solvente de polaridade intermediária e o MeOH de polaridade maior, pode-se inferir que as moléculas presentes nessa fração possuem polaridades intermediárias a elevadas, possuindo possivelmente funções oxigenadas, nitrogenadas ou até mesmo halogenadas e cadeias carbônicas não tão grandes. Essa mesma fração apresentou uma mancha amarelada na parte inferior da placa cromatográfica revelada pela solução de Ehrlich. Esse revelador indicou a presença de compostos indólicos ou derivados, possivelmente dicetopiperazinas, evidenciada pela mancha amarela na parte inferior da placa (Figura 12). Esses compostos são dímeros de aminoácidos comumente produzidos pelo metabolismo secundário principalmente de fungos, bem como pelo de actinomicetos (MARTINS; CARVALHO, 2007). O indício da presença dessas moléculas no extrato bruto da cepa BRA-036 cultivada no presente estudo desperta um grande interesse em se realizar experimentos futuros de isolamento e elucidação estrutural, tendo em vista a ampla gama de atividades biológicas que vêm sendo encontradas para as dicetopiperazinas. Em um estudo recente, Wang et al. (2015) isolaram três novas dicetopiperazinas indólicas, uma das quais capaz de promover a inibição proliferativa e morte celular por apoptose de células da linhagem de câncer de mama MCF-7. Em outro trabalho, Mollica et al. (2014) sintetizaram três dicetopiperazinas de ocorrência natural e reportaram sua atividade antiproliferativa contra várias linhagens tumorais em ensaio *in vitro*.

## 5.3. Triagem inicial do extrato bruto e frações de BRA – 036 – atividade antiproliferativa pelo Teste do MTT

A triagem inicial do potencial antiproliferativo da cepa BRA – 036 cultivada em meio A1 apresentou resultados muito promissores, uma vez que as porcentagens de inibição para o extrato bruto foram maiores que 80 % nas duas concentrações utilizadas. Em trabalho prévio, o extrato bruto dessa cepa foi testado em células PC-3/M, apresentando um percentual de inibição próximo a 60 % (SAHM, 2014). A menor atividade encontrada para a linhagem PC-3/M é provavelmente decorrente desta ser uma linhagem de câncer de próstata metastático com características altamente resistentes (PETTAWAY et al., 1996). Segundo essa linha de raciocínio, a atividade mais elevada nas células de HCT – 116 seria resultante do caráter

menos agressivo dessa linhagem, o qual refletiria numa maior sensibilidade às moléculas presentes no extrato testado. Ainda, a resistência a drogas por parte de linhagens metastáticas é, de longa data, um fenômeno já estabelecido na literatura, como mostrado no trabalho de Cillo et al. (1987), onde linhagens de melanoma metastático foram capazes de gerar variantes resistentes a metotrexato e N-(fotonacetil)-L-aspartato.

A curva concentração-efeito do extrato bruto de BRA – 036 apresentou uma CI50 de 4,28 ng/mL (Gráfico 2). Esse valor reflete a alta potência desse extrato, uma vez que boa parte dos valores de CI50 encontrados para extratos ou fármacos isolados fica próxima a poucas unidades ou dezenas de µg/mL. Williams et al. (2007) testaram para a mesma linhagem a bioatividade da Arenicolida A, uma substância isolada do actinomiceto *Sanilispora arenicola*, encontrando um valor de 30 µg/mL. Outros autores avaliaram o efeito de uma nova fenazina derivada de um actinomiceto sobre diversas linhagens tumorais, encontrando valores variando de 27 a 40 µg/mL (GAO et al., 2012). Ainda, em um trabalho realizado com o extrato de outra cepa de actinomiceto também isolada da praia da Taíba, foi encontrado uma CI50 de 15,14 µg/mL, também para a linhagem de HCT – 116 (SAHM, 2014). Assim, o extrato da cepa BRA – 036 certamente figura como uma fonte promissora de compostos bioativos, encorajando e validando tentativas de obter-se substâncias dele isoladas e avaliar-se seus potenciais antiproliferativos, mecanismos de ação, dentre outros aspectos.

O primeiro passo para a obtenção de compostos isolados com atividade biológica provenientes de uma amostra ou extrato consiste em seu fracionamento. Após o fracionamento por misturas de diferentes solventes em ordem crescente de polaridade, a atividade antiproliferativa das frações foi avaliada. Dentre os resultados, a mais promissora foi BRA– 036 AE ( AcOEt/MeOH (2:1)), que apresentou maior atividade antiproliferativa (83 %), porém sem diferença significativa entre as duas concentrações ( $P > 0,05$ ) (Gráfico 1). Essa fração foi a mesma que apresentou coloração amarelada, o que sugere que os compostos bioativos presentes no extrato bruto e conseqüentemente a fração AE responsáveis pela atividade antiproliferativa em HCT – 116 correspondem a moléculas de polaridade intermediária. Assim, os valores de inibição bastante elevados encontrados para o extrato bruto e frações obtidos do cultivo de BRA – 036 bem como a aparente correlação entre cor da fração AE e sua atividade despertam o interesse em se isolar os compostos presentes na mesma bem como em elucidar suas estruturas químicas.

#### 5.4. Curva de crescimento BRA – 036

A cepa BRA – 036 apresentou um crescimento constante seguido de uma diminuição da biomassa bacteriana no décimo dia. Os parâmetros biomassa bacteriana e rendimento do extrato não se correlacionaram (Gráfico 3A), uma vez que o rendimento dos extratos permaneceu estável até o último dia em detrimento do aumento progressivo da biomassa até o oitavo dia. Da mesma forma, a CI50 variou discretamente, apresentando valores sempre na ordem de ng/mL desde o segundo dia e apesar das alterações da biomassa (Gráfico 3B). Finalmente o rendimento do extrato e CI50 permaneceram estáveis durante todos os dias de crescimento (Gráfico 3C).

Esse resultado é de grande relevância tendo em vista que usualmente espera-se que as culturas de actinomicetos cresçam por vários dias, no mínimo 7 dias, para obtenção de extratos com substâncias citotóxicas. Os resultados desse experimento permitiram detectar que logo no segundo dia o rendimento do extrato e atividade biológica serão ótimos. Embora um estudo do perfil químico dos extratos dos diferentes dias ainda seja fundamental, os achados indicam a possibilidade de alta minimalização temporal para obtenção de extratos citotóxicos da linhagem BRA-036. Desta forma a posterior obtenção de extrato para isolamento e identificação das moléculas bioativas poderá ser bastante acelerada.

## 6. CONCLUSÃO

- Foram isolados 2 actinomicetos associados a *P. caribaeorum*, um proveniente de amostra tratada termicamente e outro não tratada.
- Os extratos das 2 cepas isoladas de *P. caribaeorum*, nomeadas BRA – 350 e 351, não atingiram o perfil mínimo de inibição do crescimento contra a linhagem de câncer colon-retal HCT – 116.
- O extrato de BRA – 036, isolada de *P. variabilis*, mostrou-se bastante potente.
- Esforços voltados para o isolamento e identificação dos compostos bioativos presentes na BRA-036, bem como a elucidação de seus mecanismos de ação parecem ser bastante promissores.

## REFERÊNCIAS

- ALLEY, M. C. et al. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. **Cancer Research**, v. 48, n. 3, p. 589–601, 1988.
- ALMEIDA, J. G. L. et al. Palyosulfonoceramides A and B: unique sulfonylated ceramides from the Brazilian zoanthids *Palythoa caribaeorum* and *Protopalythoa variabilis*. **Marine drugs**, v. 10, n. 12, p. 2846–60, dez. 2012.
- BÉRDY, J. Bioactive microbial metabolites. **The Journal of antibiotics**, v. 58, n. 1, p. 1–26, 2005.
- BERGMANN, W.; FEENEY, R. J. Contributions to the study of marine products. XXXII. The nucleosides of sponges. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 16, p. 981–987, 1951.
- BOK, J. W. et al. Genomic mining for *Aspergillus* natural products. **Chemistry and Biology**, v. 13, n. 1, p. 31–37, 2006.
- CANCER RESEARCH UK. **Cytarabine (Ara C, cytosine arabinoside)**. Disponível em: <<http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/cancers-in-general/treatment/cancer-drugs/cytarabine>>. Acesso em: 25 mar. 2015.
- CAMPOS, Felipe Ferreira. **Diversidade de bactérias associadas ao muco do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (cnidaria, anthozoa) do litoral sul de Pernambuco**. 2011. Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) – Programa de pós-graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, 2011.
- CILLO, C. et al. Generation of drug-resistant variants in metastatic B16 mouse melanoma cell lines. **Cancer Research**, v. 47, n. 10, p. 2604–2608, 1987.
- COHEN, S. S. The mechanisms of lethal action of arabinosyl cytosine (araC) and arabinosyl adenine (araA). **Cancer**, v. 40, p. 509–518, 1977.
- COSTA-LOTUFO, L. V. et al. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: historico & perspectivas. **Química Nova**, v. 32, p. 703–716, 2009.
- DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia. **Química Nova na Escola**, v. 7, p. 1–5, 1998.
- DUNCAN, K. et al. Bioprospecting from marine sediments of New Brunswick, Canada: exploring the relationship between total bacterial diversity and actinobacteria diversity. **Marine drugs**, v. 12, n. 2, p. 899–925, fev. 2014a.
- DUNCAN, K. R. et al. Exploring the diversity and metabolic potential of actinomycetes from temperate marine sediments from Newfoundland, Canada. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, 5 nov. 2014b.

FENICAL, W. et al. Discovery and development of the anticancer agent salinosporamide A (NPI-0052). **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 2175–2180, 2009.

FERREIRA, E. G. et al. Cytotoxic activity of hydroethanolic extracts of sponges (Porifera) collected at Pedra da Risca do Meio Marine State Park, Ceará State, Brazil. **Porifera research: Biodiversity, innovation and sustainability**, p. 313–318, 2007.

FLEMER, B. et al. Diversity and antimicrobial activities of microbes from two Irish marine sponges, *Suberites carnosus* and *Leucosolenia* sp. **Journal of Applied Microbiology**, v. 112, n. 2, p. 289–301, 2012.

GAO, X. et al. A novel anticancer and antifungus phenazine derivative from a marine actinomycete BM-17. **Microbiological Research**, v. 167, n. 10, p. 616–622, 2012.

GERWICK, W. H.; FENNER, A. M. Drug Discovery from Marine Microbes. **Microbial Ecology**, v. 65, n. 4, p. 800–806, 2013.

GLOBOCAN IARC. **All Cancers (excluding non-melanoma skin cancer) Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012**. Disponível em: <[http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx)>. Acesso em: 31 maio 2015.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

Health Guide – Colon Cancer. **The New York Times**, New York, 18 dez. 2013. Disponível em: <<http://www.nytimes.com/health/guides/disease/colon-cancer/chemotherapy.html>>. Acesso em: 31 maio 2015.

INCA. **O que é o Câncer**. Disponível em: <[http://www1.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=322](http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322)>. Acesso em: 04 maio 2015.

JENSEN, P. R. et al. Marine actinomycete diversity and natural product discovery. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 87, p. 43–48, 2005.

JIMENEZ, P. C. et al. Biological activity in extracts of ascidians (Tunicata, Ascidiacea) from the northeastern Brazilian coast. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 287, p. 93–101, 2003.

JUNG, D. et al. Application of a new cultivation technology, I-tip, for studying microbial diversity in freshwater sponges of Lake Baikal, Russia. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 90, p. 417–423, 2014.

JUSTICE, S. S. et al. Morphological plasticity as a bacterial survival strategy. **Nature reviews. Microbiology**, v. 6, n. 2, p. 162–168, 2008.

KOLLÁR, P. et al. Marine natural products: Bryostatins in preclinical and clinical studies. **Pharmaceutical biology**, v. 52, n. 2, p. 237–42, 2014.



KRISHNAN, K.; MANI, A.; JASMINE, S. Cytotoxic Activity of Bioactive Compound 1, 2-Benzene Dicarboxylic Acid, Mono 2- Ethylhexyl Ester Extracted from a Marine Derived Streptomyces sp. VITSJK8. **International Journal of Molecular and Cellular Medicine**, v. 3, n. 4, p. 246–254, 2014.

LAM, K. S. **Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes** *Current Opinion in Microbiology*, 2006.

LEAL, M. C. et al. Trends in the discovery of new marine natural products from invertebrates over the last two decades - where and what are we bioprospecting? **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, 2012.

LI, Z. Y.; LIU, Y. Marine sponge Craniella australiensis-associated bacterial diversity revelation based on 16S rDNA library and biologically active Actinomycetes screening, phylogenetic analysis. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 410–416, 2006.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 12<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MARTINS, M. B.; CARVALHO, I. **Diketopiperazines: biological activity and synthesis** *Tetrahedron*, 2007.

MOLLICA, A. et al. Synthesis and anti-cancer activity of naturally occurring 2,5-diketopiperazines. **Fitoterapia**, v. 98, p. 91–97, 2014.

MOORE, B. S. et al. Salinamides, antiinflammatory depsipeptides from a marine streptomyces. **Journal of Organic Chemistry**, v. 64, n. 4, p. 1145–1150, 1999.

MOORE, R. E.; SCHEUER, P. J. Palytoxin: a new marine toxin from a coelenterate. **Science (New York, N.Y.)**, v. 172, n. 982, p. 495–498, 1971.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, dez. 1983.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of natural products**, v. 75, n. 3, p. 311–35, 23 mar. 2012.

PETTAWAY, C. A. et al. Selection of Highly Metastatic Variants of Different Human Prostatic Carcinomas Using Orthotopic Implantation in Nude Mice. **Clinical Cancer Research**, v. 2, n. 9, p. 1627–1636, 1996.

PINE, L.; HOWELL, A.; WATSON, S. J. Studies of the morphological, physiological, and biochemical characters of Actinomyces bovis. **Journal of general microbiology**, v. 23, p. 403–424, 1960.

PLIMACK, E. R. et al. A phase I study of temsirolimus and bryostatin-1 in patients with metastatic renal cell carcinoma and soft tissue sarcoma. **The oncologist**, v. 19, n. 4, p. 354–5, 2014.

PROCÓPIO, R. E. DE L. et al. Antibiotics produced by Streptomyces. **The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 16, n. 5, p. 466–71, 2012.

RADJASA, O. K. et al. Highlights of marine invertebrate-derived biosynthetic products: Their biomedical potential and possible production by microbial associates. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 22, p. 6658–6674, 2011.

RISS, Terry L., MORAVEC R. A., Niles A.L. et al. **Viability Assays**. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004.

SAHM, Bianca del Banco. **Prospecção de substâncias com potencial anticâncer em microrganismos associados ao zoantídeo *Protopalythoa variabilis* (cnidaria, anthozoa)**. 2014. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

SCHAUFELBERGER, D. E. et al. The large-scale isolation of bryostatin 1 from *Bugula neritina* following current good manufacturing practices. **Journal of natural products**, v. 54, n. 5, p. 1265–1270, 1991.

SELEGHIM, M. H. R. et al. Antibiotic, cytotoxic and enzyme inhibitory activity of crude extracts from Brazilian marine invertebrates. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 287–318, 2007.

SHI, B.; XIA, X. Morphological changes of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* in response to temperature selection. **Current Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 120–123, 2003.

SILVA, J. F. et al. Growth of the tropical zoanthid *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria: Anthozoa) on reefs in northeastern Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, n. ahead, p. 00–00, 2015.

SOUSA, A. M. et al. Improvements on colony morphology identification towards bacterial profiling. **Journal of Microbiological Methods**, v. 95, n. 3, p. 327–335, 2013.

SOUZA, D. S. L. et al. Identification of a novel  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase (Pcb-NAHA1) from marine Zoanthid *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria, Anthozoa, Zoanthidea). **Protein Expression and Purification**, v. 58, n. 1, p. 61–69, 2008.

STEINERT, G.; TAYLOR, M. W.; SCHUPP, P. J. Diversity of Actinobacteria Associated with the Marine Ascidian *Eudistoma toaealensis*. **Marine Biotechnology**, 2015.

TAN, L.; MA, D. Total synthesis of salinamide A: A potent anti-inflammatory bicyclic depsipeptide. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 47, n. 19, p. 3614–3617, 2008.

TONON, L. A. C. **Taxonomia de procariontes isolados de cnidários**. 2010. 208 p. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

UDWARY, D. W. et al. Genome sequencing reveals complex secondary metabolome in the marine actinomycete *Salinispora tropica*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 25, p. 10376–10381, 2007.

WANG, F. et al. Indole diketopiperazines from endophytic *Chaetomium* sp 88194 induce breast cancer cell apoptotic death. **Scientific Reports**, v. 5, p. 9294, 2015.

WATVE, M. G. et al. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? **Archives of microbiology**, v. 176, n. 5, p. 386–90, nov. 2001.

WHO. **10 facts about cancer**. Disponível em:  
<<http://www.who.int/features/factfiles/cancer/en/>>. Acesso em: 31 maio 2015.

WILKE, D. V. et al. Pro-apoptotic activity of lipidic  $\alpha$ -amino acids isolated from *Protopythia variabilis*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 22, p. 7997–8004, 2010.

WILLIAMS, P. G. et al. Arenicolides A-C, 26-membered ring macrolides from the marine actinomycete *Salinispora arenicola*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 72, n. 14, p. 5025–5034, 2007.

ZOTCHEV, S. B. Marine actinomycetes as an emerging resource for the drug development pipelines. **Journal of Biotechnology**, v. 158, n. 4, p. 168–175, 2012.