



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**LARISSA ALVES GUIMARÃES**

**POTENCIAL ANTICÂNCER DE ACTINOMICETOS RECUPERADOS DO  
SEDIMENTO DA PRAIA DA PEDRA RACHADA, PARACURU, CEARÁ.**

**FORTALEZA - CE**

**2013**

LARISSA ALVES GUIMARÃES

POTENCIAL ANTICÂNCER DE ACTINOMICETOS RECUPERADOS DO SEDIMENTO  
DA PRAIA DA PEDRA RACHADA, PARACURU, CEARÁ.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Letícia Veras Costa Lotufo  
Co-orientadora: Dra. Paula Christine Jimenez

FORTALEZA - CE  
2013

POTENCIAL ANTICÂNCER DE ACTINOMICETOS RECUPERADOS DO SEDIMENTO  
DA PRAIA DA PEDRA RACHADA, PARACURU, CEARÁ.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Aprovada em: 19/12/2013.

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Letícia Veras Costa Lotufo (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Ana Paula Negreiros Nunes Alves  
Universidade Federal do Ceará - UFC

*À minha mãe,  
pelo exemplo de espírito materno dedicado  
e por me inspirar com seu incansável gosto pelos estudos,  
dedico.*

## AGRADECIMENTOS

À **Dra. Leticia Lotufo**, que preencheu esses anos, desde a minha iniciação científica, com entusiasmo, incentivo, alegria e, sobretudo, com preciosos aprendizados. Agradeço, também, pelos puxões de orelha e pelas palavras de carinho e tranquilidade sempre certos. Não há como esconder minha profunda admiração pela brilhante orientadora que ela é, e imensa gratidão pela amizade e pela confiança em mim no desempenho deste trabalho.

À **Dra. Paula Jimenez**, pela amizade e co-orientação científica deste trabalho. Por acompanhar de perto os meus passos pela vida de cientista, me presenteando com seus valiosos conselhos, no âmbito pessoal e profissional, confiando e torcendo por mim a cada etapa do trabalho realizada. Por me encorajar e tranquilizar sempre que preciso. Por me inspirar na carreira de cientista e pela dedicação a este trabalho, sou imensamente grata.

Ao **Msc. Elthon Ferreira**, o Elthito, pela dedicação e pelos ensinamentos, desde a iniciação científica. Pela disponibilidade em ajudar no que preciso for, pelas palavras de incentivo e pela amizade.

Ao **Dr. Diego Wilke**, pelo entusiasmo em orientar e ensinar. Pela paciência, pela simpatia e pela disponibilidade em ajudar sempre que precisei durante a realização deste trabalho.

À querida amiga, **Bianca Sahn**, que compartilhou cada momento dessa jornada. Desde a disciplina de Farmacologia Geral, torcemos juntas pela entrada no Mestrado e pelo sucesso dos nossos trabalhos. Nos dias alegres ou nos dias mais difíceis, sua amizade, apoio, admiração e incentivo foram muito importantes em cada passo dado até aqui. Guardarei com carinho tudo..

Aos amigos do **Laboratório de Ecotoxicologia Marinha (ECOTOX)**, pela prazerosa convivência, por compartilharem todos os momentos vividos, dentro e fora do laboratório, pelo carinho e apoio constantes, a final de contas, somos mesmo uma família. De cada um eu guardo o aprendizado e a amizade, que, sem dúvidas, contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional até hoje. Em especial, agradeço a **Ivna Vasconcelos**, por toda a dedicação e ajuda no cultivo dos nossos actinomicetos, por sempre estar disposta a trabalhar seja qual for o dia da semana. Igualmente grata, as amigas Lívia Pitombeira, Marcionília Pimentel, Karine Pires, Évila Damasceno, Jeamylyle Nilin, Paula Abreu, Andressa Pâmela e Lioíza Freitas pela torcida, companheirismo e pela partilha de tantos momentos importantes. Aos amigos Allyson Queiroz (também meu irmão de cor e de magreza), Renan Daku e Rafael Viera pelo apoio e companheirismo.

À **Evelyne Alves**, pela positividade e pela amizade e por sempre se dispor a me ajudar nos experimentos realizados neste trabalho. Ao **Dr. Danilo Damasceno**, pela disponibilidade, pelos ensinamentos, apoio e troca de ideias, em especial nas etapas nas últimas etapas deste trabalho.

À amiga **Patrícia Freitas**, por ser minha “correspondente da química” desde a iniciação científica, compartilhando todos os momentos, dos mais alegres aos mais aflitos. À **Dra. Thiciana Sousa**, pela parceria na realização da parte química desse trabalho e por compartilhar os momentos de intenso trabalho com a parte da “micro”.

Aos meus pais, **Eliana** e **Capistrano**, pelo amor, dedicação, incentivo desmedidos. Aos meus irmãos, **Juliana** e **Lucas**, por serem meus xodós e, também, parte de mim. Minha gratidão a vocês quatro é, igualmente, sem medidas.

Ao meu tão querido, **Pedro Henrique**, pelo amor, pelo cuidado e pelo carinho, que com seu jeito discreto de ser, enchem minha vida de felicidade. Seu apoio e tranquilidade foram essenciais em todos os momentos.

À **Mariana Castelo**, pela amizade de berço, pela vida inteira de cumplicidade, pela torcida e pelo apoio em todos os momentos.

À vó **Rosália**, vó de coração, pelo constante incentivo, pelos ensinamentos e pelas palavras sinceras.

A todos demais familiares e amigos que sempre me acolhem com carinho e torcem pelo meu sucesso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pela bolsa de estudo concedida.

## RESUMO

O sedimento marinho é uma importante fonte de microrganismos produtores de metabólitos secundários com propriedades biomédicas. Os actinomicetos são bactérias Gram-positivas e filamentosas bem conhecidas como profícuos produtores de produtos naturais com diversas atividades biológicas. A costa do Ceará vem sendo investigada, há pouco mais de 10 anos, quanto ao potencial farmacológico abrigado em esponjas, tunicados e corais, porém há ainda poucos registros de microrganismos como foco da prospecção de produtos naturais bioativos. No presente trabalho, os extratos brutos produzidos a partir dos 26 actinomicetos recuperados do sedimento coletado na Praia da Pedra Rachada, no município do Paracuru, Ceará, foram testados quanto a sua citotoxicidade em células tumorais em cultura. Dos 26 extratos brutos testados, 16 inibiram mais que 65% do crescimento de células HCT-116. A cepa denominada BRA-090, cujo extrato teve o maior percentual de inibição do crescimento celular (98,38%), apresentou  $CI_{50}$  de 0,19  $\mu\text{g/mL}$  e foi selecionada para crescer em larga escala a fim de isolar o(s) princípio(s) ativo(s). O fracionamento químico utilizando técnicas como cromatografia *flash* e CLAE levaram a identificação de três cromomicinas conhecidas (cromomicinas A2, A3 e desmetilcromomicina A2) além de duas massas referentes a prováveis novas moléculas da mesma classe. A cromomicina A2 (C-A2) foi isolada e teve a sua atividade citotóxica avaliada para outras seis linhagens tumorais, com  $CI_{50}$  variando de 7,8 a 49,5 nM para exposições durante 48 e 72h de duração. Com 24h, não foi encontrado valor  $CI_{50}$  abaixo de 50 nM. A C-A2 também foi testada contra a linhagem não tumoral MRC-5, com  $CI_{50}$  de 109nM. As células MALME-3M, para qual se obteve a melhor atividade no tempo de 48h de incubação, foi a escolhida para investigar o potente efeito citotóxico de C-A2 nas concentrações de 10, 20, 30 e 40 nM de C-A2. A C-A2 mostrou reduzir a viabilidade de células MALME-3M de forma concentração-dependente, e aumentou o número de células não viáveis nas duas maiores concentrações testadas. Quanto as alterações no ciclo celular, C-A2 apresentou, em particular para o tratamento com 40 nM, redução da fase S e aumento da fase G0/G1. Na análise morfológica das células MALME-3M, sobremaneira aquelas expostas a concentrações de 30 e 40 nM, foram observadas diversas alterações, tais como *blebs* de membrana plasmática, redução do volume celular e fragmentação de DNA, características sugestivas de apoptose. No tratamento com 30 nM, diversos fragmentos celulares similares a autofagossomos estavam presentes, sugerindo, ainda, a ocorrência de autofagia.

**Palavras-chave:** Cromomicina A2. Citotoxicidade. Células MALME-3M.

## ABSTRACT

The sea sediment is an important source of microorganisms that synthesize secondary metabolites with biomedical proprieties. During the past 10 years, the coast of Ceará has been prospected for the pharmacological potential housed in sponges, tunicates and corals, but little data are available regarding that of the microorganisms. In the present study, crude extracts from actinomycetes recovered from sediment collected at Pedra Rachada Beach, Paracuru, Ceará State, were evaluated for their cytotoxicity against tumor cells in culture. Among the 26 extracts, 16 inhibited more than 65% of growth of HCT-116 cells. The extract derived from the strain BRA-090, which exhibited the highest percentage of cell growth inhibition (98.38%), showed  $IC_{50}$  of 0.19  $\mu\text{g/mL}$  and was grown in large scale in order to isolate active principles. Chemical fractionation techniques, such as flash chromatography and HPLC, were applied to this extract, which led to identification of three known chromomycins (chromomycins A2, A3 and desmetilchromomycin A2) and also two molecular masses regarding probable new molecules of the same class. Chromomycin A2 (C-A2) was isolated and the cytotoxic activity was evaluated across a panel of cell lines, with  $IC_{50}$  ranging from 7.8 to 49.5 nM for exposures of 48 and 72h. For 24h exposure period, none of the  $IC_{50}$  values were found to be below 50 nM. C-A2 was also tested against the non-tumor line MRC-5 with  $IC_{50}$  of 109 nM. The MALME-3M cells, which showed the best activity after 48h incubation, was chosen to investigate the potent cytotoxic effect of C-A2 at concentrations of 10, 20, 30 and 40 nM. C-A2 reduced viability of MALME-3M cells in concentration dependent manner and increased the number of non-viable cells in the two highest concentrations tested. As for changes in the cell cycle, C-A2 induced, particularly for treatment with 40 nM, reduction of S phase and increase in G0/G1 phase. Morphological analysis of MALME-3M cells treated with C-A2, mainly at 30 and 40 nM, presented membrane blebs, cellular volume reduction and DNA fragmentation, which are features suggestive of apoptosis. Treatment with 30 nM also induced the appearance of several cell fragments resembling autophagosomes, may suggest the occurrence of autophagy.

**Keywords:** Chromomycin A2. Cytotoxicity. MALME-3M cells.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Primeiros produtos naturais marinhos (ziconotídeo e trabectedina) e derivados (vidarabina e citarabina) a serem aprovados para uso clínico.....	15
FIGURA 2	<i>Salinispora tropica</i> e o composto antitumoral isolado do seu extrato, Salinosporamida A.....	22
FIGURA 3	Compostos bioativos obtidos a partir do extrato do actinomiceto marinho <i>Streptomyces</i> sp. isolado da ascídia <i>Eudistoma vannamei</i> .....	23
FIGURA 4	Antraciclínonas obtidas da bactéria <i>Micromonospora</i> sp. isolada de <i>Eudistoma vannamei</i> .....	24
FIGURA 5	Metabólitos secundários obtidos da bactéria <i>Pseudoalteromonas</i> sp. isolada do sedimento da Praia da Taíba. No detalhe, molécula da prodigiosina.....	25
FIGURA 6	A, Mapa com a localização do ponto de coleta do material, no município de Paracuru, a aproximadamente 84 km ao noroeste da cidade de Fortaleza. B, fotografia do local de coleta durante a maré baixa (por Diego Wilke).....	27
FIGURA 7	Métodos empregados no isolamento das bactérias do sedimento da Praia da Pedra Rachada, Paracuru, Ceará.....	28
FIGURA 8	Método empregado na criopreservação das bactérias recuperadas do sedimento da Praia da Pedra Rachada, Paracuru, Ceará.....	29
FIGURA 9	Método empregado na obtenção dos extratos do caldo de fermentação das bactérias recuperadas do sedimento da Praia da Pedra Rachada, Paracuru, Ceará.....	30
FIGURA 10	Desreplicação da fração F8 do extrato bruto da BRA-090.....	31
FIGURA 11	Estruturas das cromomicinas identificadas por LC-MS.....	32
FIGURA 12	Distribuição das 26 cepas isoladas do sedimento da Praia Rachada (Paracuru-CE) quanto ao método (A) e ao meio de cultura (B) de isolamento. M1, método 1, sedimento foi seco e carimbado com rolha de esponja estéril em placas de ágar; M2, método 2, porção do sedimento foi suspensa em água do mar estéril, aquecido a 55°C e estriado em placas de ágar. SCA, amido-caseína; SWA, água do mar; TMA, ágar minerais traços.....	39
FIGURA 13	Inibição do crescimento de células HCT-116 dos extratos brutos obtidos dos actinomicetos isolados da Praia da Pedra Rachada (Paracuru-CE), pelo ensaio do MTT, 72h. Os dados correspondem a média $\pm$ erro-padrão da média de 2 experimentos em duplicata.....	40
FIGURA 14	Fotografias das colônias da BRA-090 (por Tito Lotufo). A, visão geral da placa; B, detalhe das colônias.....	41
FIGURA 15	Fluxograma esquemático do fracionamento do extrato bruto da BRA-090.....	42
FIGURA 16	Efeito da C-A2 na viabilidade e proliferação de células MALME-3M por meio de exclusão pelo azul de Trypan após 48h de exposição. O controle negativo (C) recebeu apenas o veículo de diluição da substância (DMSO 0,4%). A doxorrubicina (DOX) 100 nM foi utilizada como controle positivo. As barras em azul correspondem ao número de células viáveis e as barras em cinza correspondem ao número de células não viáveis. Os dados	44

	correspondem à média $\pm$ E.P.M. de 3 experimentos independentes, realizados em duplicata. *p < 0,05 comparado ao controle por ANOVA seguido por teste de Dunnet.....	
FIGURA 17	Microfotografias de células MALME-3M controle negativo (DMSO 0,4%), positivo (doxorubicina 100nM) e tratadas com C-A2 10, 20, 30 e 40 nM, após 48 de incubação e coradas com kit de coloração segundo Romanowsky. Ilustrações representativas de cada tratamento analisadas em microscópio óptico, sob aumento de 200X. As setas pretas indicam a formação dos <i>blebs</i> de membrana; as setas verdes, a fragmentação de DNA, e as setas vermelhas, os fragmentos celulares similares a autofagossomos.....	45
FIGURA 18	Viabilidade (A e B) designada pela integridade de membrana plasmática e número de células (C) MALME-3M, por citometria de fluxo, após 48h de exposição a 10, 20, 30 e 40 nM de C-A2. O controle negativo (C) recebeu apenas o veículo de diluição da substância (DMSO 0,4%). A doxorubicina (DOX) 100 nM foi utilizada como controle positivo. Os dados apresentados correspondem à média $\pm$ E.P.M. de 3 experimentos independentes, realizados em duplicata, com 5000 eventos adquiridos por replicata. *p < 0,05 comparado ao controle por ANOVA seguido por teste de Dunnet.....	46
FIGURA 19	Efeito da C-A2 na distribuição das fases do ciclo celular (A) e na fragmentação internucleossomal (B) em células MALME-3M tratadas com 10, 20, 30 e 40 nM, avaliado por citometria de fluxo após 48h de incubação. O controle recebeu apenas o veículo de diluição da substância (DMSO 0,4%). A doxorubicina (DOX) 100 nM foi utilizada como controle positivo. Os dados apresentados correspondem à média $\pm$ E.P.M. de n experimentos independentes, realizados em duplicata, com 5000 eventos adquiridos por replicata. *p < 0,05 comparado ao controle por ANOVA seguido por teste de Dunnet.....	48
FIGURA 20	Efeito concentração-dependente de C-A2 (10, 20, 30 e 40 mM) sobre as fases do ciclo celular em MALME-3M. O controle recebeu apenas o veículo de diluição da substância (DMSO 0,4%). A doxorubicina (DOX) 100 nM foi utilizada como controle positivo. Os histogramas foram obtidos pelo programa Accuri™ C6 Software 1.0.264.21 e modelados pelo programa ModFit LT. Ilustração de uma replicata representativa de cada tratamento.....	49

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Compostos isolados ou derivados de fontes marinhas aprovados pelo FDA ( <i>Food and Drug Administration</i> , EUA) ou em fase de testes clínicos (GERWICK e MOORE, 2012; MAYER et al., 2010; WATERS et al., 2010). N.A., não aplicável.....	17
TABELA 2	Linhagens celulares utilizadas no ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> cedidas pelo NCI-USA ( <i>National Cancer Institute, Bethesda</i> , EUA) ou obtidas do ATCC ( <i>American Type Culture Collection</i> ).....	33
TABELA 3	Valores de $CI_{50}$ e IC 95% ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos extratos brutos dos actinomicetos recuperados do sedimento da Praia da Pedra Rachada (Paracuru-CE), obtidos a partir da média e respectivos E.P.M. de 2 experimentos independentes em duplicata determinados por regressão não-linear gerado no programa GraphPad Prism 5.0. (N.D.: Não determinado).....	41
TABELA 4	Valores de $CI_{50}$ (nM) da C-A2, em várias células tumorais, avaliados pelo ensaio do MTT em 24, 48 e 72h. $CI_{50}$ e IC 95% obtidos a partir da média e respectivos E.P.M. de 2 experimentos em duplicata determinadas por regressão não-linear no programa GraphPad Prism 5.0.....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de etila
ANOVA	<i>Analisis of Variance</i>
B. O. D.	<i>Biochemical Oxygen Demand</i>
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOX	Doxorrubicina
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazólio
NCE	Novas Entidades Euímicas (do inglês, <i>New Chemical Entities</i> )
PBS	<i>Phosphate Buffer Solution</i>
PI	Iodeto de propídeo
RPMI	<i>Roswell Parrk Memorial Institute Medium</i>
SCA	<i>Starch casein agar</i>
SWA	<i>Seawater agar</i>
TMA	<i>Agar trace minerals</i>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>1.1 Produtos Naturais Marinhos</b> .....	13
<b>1.2 Microrganismos Marinhos</b> .....	19
1.2.1 Actinomicetos.....	20
1.2.2 Estudos no Litoral Cearense.....	22
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>26</b>
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	26
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	26
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
<b>3.1 Coleta do Material e Cultivo dos Microrganismos</b> .....	27
3.1.1 Preservação dos microrganismos isolados .....	29
<b>3.2 Obtenção dos Extratos Brutos</b> .....	30
<b>3.3 Desreplicação e Fracionamento Químico</b> .....	31
<b>3.4 Avaliação da Atividade Citotóxica <i>in vitro</i></b> .....	33
3.4.1 Cultivo das células.....	33
3.4.2 Ensaio do MTT.....	34
<b>3.5 Análise dos Efeitos de C-A2 sobre Células MALME-3M</b> .....	35
3.5.1 Avaliação da atividade antiproliferativa e análise morfológica por microscopia óptica .....	35
3.5.2 Estudos por citometria de fluxo.....	36
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>39</b>
<b>4.1 Isolamento dos Microrganismos</b> .....	39
<b>4.2 Desreplicação e Fracionamento Químico do Extrato da BRA-090</b> .....	41
<b>4.3 Avaliação da Atividade Citotóxica <i>in vitro</i></b> .....	43
<b>4.5 Efeitos Sobre Células MALME-3M</b> .....	44
4.5.1 Viabilidade e morfologia celular por microscopia ótica .....	44
4.5.2 Viabilidade e número de células por citometria de fluxo.....	47
4.5.3 Ciclo celular e fragmentação internucleossomal .....	48
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>51</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>60</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>61</b>
<b>ANEXO I – Composição dos meios de cultura para microrganismos</b> .....	<b>69</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Produtos Naturais Marinhos

Os recursos naturais são reconhecidamente dotados de notável potencial para biossíntese de compostos, *i. e.*, os produtos naturais, com aplicações farmacológicas e terapêuticas. A exploração incipiente dessa fonte pelo homem iniciou ainda nas antigas civilizações e, até os dias atuais, ela continua a atrair inúmeras pesquisas em busca de novas moléculas para inovação ou aprimoramento dos tratamentos de diversas doenças.

Oriundas do metabolismo primário ou secundário dos organismos vivos, tais substâncias podem pertencer as mais diversas classes de compostos orgânicos e o papel que desempenham é de importância crucial no processo adaptativo destes organismos ao ambiente e decisiva para o sucesso evolutivo e o aumento da biodiversidade dos ecossistemas. As estratégias de competição dos seres vivos por espaço e de defesa contra patógenos, em especial pelos sésseis ou com capacidade locomotiva reduzida, tem suscitado grande interesse, uma vez que os metabólitos envolvidos nestas funções têm mostrado potencial aplicabilidade clínica (COSTA-LOTUFO et al., 2009).

As plantas e microrganismos terrestres têm sido as mais tradicionais fontes de produtos naturais, como o analgésico morfina das papoulas (*Papaver somniferum*), os digitálicos ou glicosídeos cardiotônicos das dedaleiras (*Digitalis* spp.) e o antibiótico penicilina dos fungos (*Penicillium* spp.). Mais recentemente, os produtos de origem marinha vêm conquistando espaço entre as moléculas de sucesso nos respectivos testes pré-clínicos e clínicos (MOLINSKI et al., 2009).

A notoriedade do papel dos produtos naturais na descoberta e no desenvolvimento de medicamentos acentua-se ainda mais quando, nos últimos 30 anos, as estruturas naturais permanecem líderes em prover ou a molécula ou o grupo funcional para mais de 60% das novas entidades químicas (NCE, do inglês *New Chemical Entities*) (NEWMAN e CRAGG, 2012).

Mesmo tendo as técnicas de química combinatória predominado como fonte de descobertas de novos compostos, nos trabalhos revisados por Newman & Cragg (2012) entre 1981 e 2010, apenas um único medicamento é conhecido, até então, por ter sido desenvolvido de fonte integralmente sintética por meio dessas técnicas, o sorafenib (Nexavar<sup>®</sup>), aprovado para tratamento de carcinoma de rim e fígado. Estes dados não enfraquecem o mérito desse tipo de abordagem química, visto que tem importante aplicação no aspecto de otimização da

estrutura química uma vez que o esqueleto ativo foi identificado, todavia impulsionam as expectativas e os esforços na prospecção de substâncias de importância biomédica de fontes naturais.

Ao horizonte dos longos e, muitas vezes, árduos caminhos em busca por novos agentes terapêuticos, o ambiente marinho aponta como uma extensa, densa e rica fronteira para prospecção farmacológica de compostos bioativos. Mares e oceanos cobrem cerca de 70% da superfície da Terra e compõe mais de 90% do volume de sua crosta, e é, segundo especialistas, dotado de ecossistemas, como os recifes de corais ou o assoalho profundo, que apresentam biodiversidade superior a das florestas tropicais (FENICAL, 2006; LAM, 2006).

A exploração desse ambiente tardou em deslanchar na história da Farmacologia, permanecendo até os anos 50, distante dos interesses dos cientistas de produtos naturais e, nos seus primeiros dias, restrita aos organismos mais visíveis e facilmente coletados, principalmente devido às suas profundidades. No entanto, foi na década de 70, com o aprimoramento de técnicas e equipamentos de mergulho seguros, que diversas pesquisas puderam explorar de forma efetiva os recursos marinhos e avançar para mais além das zonas entremarés (GERWICK e MOORE, 2012).

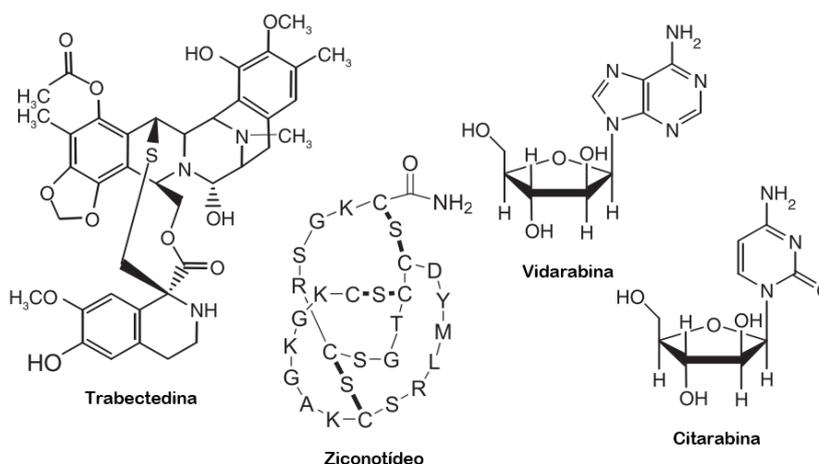
Com o passar dos anos, o crescente interesse em desbravar ainda mais a biodiversidade de mares e oceanos fez com que, no ano 2000, cientistas marinhos de diversos lugares do mundo emplasassem uma iniciativa inédita para explicar a diversidade, a distribuição e a abundância da vida marinha, o Censo da Vida Marinha. Após 10 anos de intenso trabalho desempenhado por milhares de cientistas, utilizando-se de vários recursos tecnológicos, a estimativa da diversidade de espécies marinhas pulou de 230.000 para 250.000 e extrapolou para pelo menos um milhão de tipos de vida marinha e para dezenas ou mesmo centenas de milhões de tipos de microrganismos. Ainda assim, é sabido que mais esforços serão necessários para chegar a uma estimativa mais segura, já que para mais de 20% do volume do oceano, a base de dados do Censo ainda não tem nenhum registro, e muito poucos registros para outras vastas áreas. Esta diversidade surpreendente de vida oferece, de fato, um enorme recurso para a descoberta de possíveis novas drogas para o tratamento de doenças (AUSUBEL, CRIST e WAGGONER, 2010; HILL e FENICAL, 2010).

O isolamento de quantidades significativas de prostaglandinas da gorgônia caribenha *Plexaura homomalla* por Weinheimer e Spragginsthe, em 1969 (WEINHEIMER e SPRAGGINS, 1969), é comumente considerado o marco inicial da química de produtos naturais marinhos, embora o trabalho pioneiro nessa área date do início dos anos 50, quando Bergmann e Feeney isolaram derivados raros de nucleosídeos da esponja caribenha

*Cryptotethya crypta*, os arabinonucleosídeos espongotimidina e espongouridina (BERGMANN e FEENEY, 1951). Estes compostos serviram de modelo para o desenvolvimento de uma nova classe de análogos sintéticos, como a vidarabina (adenina-arabinosídeo, Ara-A) e a citarabina (citosina-arabinosídeo, Ara-C) usados até hoje na quimioterapia de infecções virais e de câncer, respectivamente (figura 1). Desde então, as buscas pelos “fármacos do mar” e as expectativas na bioprospecção marinha foram impulsionadas (MAYER et al., 2010; PUTZ e PROKSCH, 2010).

Nos 20 anos que se seguiram, houve intenso trabalho de isolamento químico e milhares de moléculas peculiares foram isoladas, no entanto, nenhum fármaco marinho tinha sido lançado no mercado até então, principalmente em razão da preferência da indústria farmacêutica pela síntese baseada na química combinatória (MOLINSKI et al., 2009). O primeiro produto natural marinho a ser comercializado como medicamento foi o ziconotídeo ou  $\omega$ -conotoxina MVIIA (Prialt<sup>®</sup>, figura 1), um peptídeo analgésico isolado a partir do molusco *Conus magus* na década de 80 (OLIVERA et al., 1985), e seu uso foi aprovado nos EUA para o tratamento de dor crônica severa (BLUNT, BUCKINGHAM e MUNRO, 2012; MAYER et al., 2010).

Na década de 90, a trabectedina (ET-743, Yondelis<sup>®</sup>, figura 1), um composto com atividade antitumoral, foi isolada da ascídia caribenha *Ecteinascidia turbinata* (POMMIER et al., 1996) e seu uso clínico foi aprovado na Europa para tratamento de sarcomas de tecidos moles e câncer de ovário, ademais diversos ensaios clínicos estão em andamento com outros tipos de tumores, como de próstata, mama, osteossarcoma e tumores sólidos pediátricos (CLINICAL TRIALS, 2013; GERWICK e MOORE, 2012; RATH et al., 2011).



**Figura 1.** Primeiros produtos naturais marinhos (ziconotídeo e trabectedina) e derivados (vidarabina e citarabina) a serem aprovados para uso clínico (GERWICK e MOORE, 2012; IMHOFF, LABES e WIESE, 2011).

Diversos compostos bioativos têm sido isolados de organismos marinhos e suas respectivas atividades biológicas extensivamente investigadas, inclusive, alguns estão atualmente a avançar pelas fases de testes clínicos (BLUNT, BUCKINGHAM e MUNRO, 2012). Essa intensificação da exploração dos organismos marinhos para obter novos produtos foi concomitante a diversos avanços tecnológicos em coletas de profundidade, passando pela sofisticação dos bioensaios, além da melhoria da instrumentação para isolamento, análise e caracterização química dos compostos. A invenção e o desenvolvimento do espectrofotômetro de ressonância nuclear magnética (RMN), nos anos 70, por exemplo, trouxe importante contribuição para elucidação das estruturas dos produtos naturais marinhos (COSTA-LOTUFO et al., 2009; HU, G.-P. et al., 2011; MOLINSKI, 2010).

Os protótipos isolados ou derivados de organismos marinhos em fase de teste clínico possuem diversos alvos terapêuticos como canais iônicos, enzimas, DNA, microtúbulos, lisossomos, proteossomos, além de indução de estresse oxidativo e modulação do sistema imunológico (GERWICK e MOORE, 2012). As respectivas informações sobre estes protótipos, como a fase de teste clínico, origem e o uso terapêutico, estão sistematizadas na tabela 1.

A indicação para tratamento do câncer se sobressai dentre os protótipos marinhos. De fato, é no estudo e na terapêutica do câncer que as moléculas marinhas têm proporcionado significativa contribuição, em especial na identificação de novos alvos terapêuticos. Considerando que a atividade anticâncer foi a mais investigada até cerca de 12 anos atrás, mais recentemente uma gama maior de ensaios seletivos foram implantados e diversos compostos têm demonstrado uma variedade de atividades farmacológicas, *i. e.*, antibacteriana, anticoagulante, anti-inflamatória, antifúngica, anti-helmíntico, antiplaquetária, antiprotozoária, atividade antiviral, dentre outras (BLUNT, BUCKINGHAM e MUNRO, 2012; MAYER et al., 2010, 2013; MOLINSKI et al., 2009)

**Tabela 1.** Compostos isolados ou derivados de fontes marinhas aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*, EUA) ou em fase de testes clínicos (GERWICK e MOORE, 2012; MAYER et al., 2010; WATERS et al., 2010). N.A., não aplicável.

Status clínico	Composto	Nome comercial	Organismo fonte/ Provável produtor	Classe química	Aplicação terapêutica
<b>Aprovado</b>	Citarabina, Ara-C	Cytosar-U	Esponja/bactéria	Nucleosídeo	Câncer
	Vidarabina, Ara-A	Vira-A	Esponja/bactéria	Nucleosídeo	Antiviral
	Ziconotídeo	Prialt	Molusco	Peptídeo	Dor
	Mesilato de eribulina, ET389	Halaven	Esponja/bactéria	Policetídeo	Câncer
	Ômega-3 etil-éster	Lovaza	Peixe	Ácido graxo	Hipertrigliceridemia
	Trabectedina, ET-743	Yondelis	Ascídia/bactéria	Alcalóide	Câncer
	Brentuximab vedotin	Adcetris	Molusco/ cianobactéria	Anticorpo conjugado a droga	Câncer
<b>Fase III</b>	Plitidepsina	Aplidin	Ascídia/bactéria	Depsipeptídeo	Câncer
	Soblidodina, TZT-1027	N.A.	cianobactéria	Peptídeo	Câncer
<b>Fase II</b>	PM00104	Zalypsis	Molusco	Alcalóide	Câncer
	Glembatumumab Vedotin, CDX-011	N.A.	Molusco/bactéria	Anticorpo conjugado a droga	Câncer
	DMXBA, GTS-21	N.A.	Nemertíneo	Alcalóide	Esquizofrenia
	Plinabulina, NPI-2358	N.A.	Fungo	Dicetopiperazina	Câncer
	Elisidepsina, PM1004	Irlavec	Molusco/bactéria	Depsipeptídeo	Câncer
	Pseudopterosina	N.A.	Coral	Diterpeno glicosilado	Cicatrização
	Sintadotina, tasidotina (ILX-651)	N.A.	Bactéria	Peptídeo	Câncer
<b>Fase I</b>	SGN-75	N.A.	Molusco/ Cianobactéria	Anticorpo conjugado a droga	Câncer
	ASG-5ME	N.A.	Molusco/ Cianobactéria	Anticorpo conjugado a droga	Câncer
	Briostatina 1	N.A.	Briozoário/ proteobactéria	Policetídeo	Câncer, Alzheimer
	Hemiasterlina, E7974	N.A.	Esponja/bactéria	Tripeptídeo	Câncer
	Salinosporamida A, NPI-0052	Marizomib	Bactéria	$\beta$ -lactona- $\gamma$ -lactâmico	Câncer

Não é surpreendente que grande parte dos esforços esteja empenhada na busca de novos fármacos marinhos para o tratamento de neoplasias. Novos quimioterápicos, assim como novas estratégias de tratamento, ainda permanecem como objetivo prioritário das pesquisas neste campo, em consideração ao rápido desenvolvimento de resistência a múltiplos medicamentos e à toxicidade dos tratamentos com os quimioterápicos existentes (HILL e FENICAL, 2010; OLANO, MÉNDEZ e SALAS, 2009). O câncer pode ser caracterizado como um conjunto de doenças de fundo genético, que envolve crescimento descontrolado, surgimento e espalhamento de células anormais, e por isso, é considerada uma doença complexa e de difícil tratamento (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014). Vista a sua elevada incidência em todo o mundo e a sua permanência entre as primeiras causas de mortes em países desenvolvidos e em desenvolvimento, inúmeros esforços têm sido realizados visando o desenvolvimento ou o aperfeiçoamento das terapias antineoplásicas (NCI, 2014).

Quanto à fonte dos produtos naturais marinhos em estudo clínico, são os invertebrados marinhos, como ascídias, esponjas, moluscos e briozoários, em grande parte, obtidos dos ecossistemas tropicais de águas rasas, que cederam à maioria destas moléculas, uma vez que, foram estes, os organismos que inauguraram os estudos em bioprospecção marinha. Contudo, não é evidente que o macrorganismo provedor seja o produtor dos compostos (bioativos) (BLUNT, BUCKINGHAM e MUNRO, 2012). O reconhecimento de que os invertebrados marinhos são frequentemente “povoados” de grandes quantidades de microrganismos simbiotes ou “associados”, e que estes, por sua vez, são as verdadeiras fontes dos compostos bioativos, toma ainda mais vigor à medida que os já conhecidos produtos naturais, ou moléculas muito similares a estes, foram obtidos a partir de microrganismos simbiotes. (GERWICK e FENNER, 2013; IMHOFF, LABES e WIESE, 2011; RATH et al., 2011). A briostatina 1, por exemplo, um produtos natural obtido do briozoário *Bugula neritina*, e que, atualmente, participa de mais de 80 ensaios clínicos para o câncer, teve um candidato procariótico proposto para a sua biossíntese, através de análises moleculares, a proteobactéria endossimbionte *Candidatus Endobugula sertula* (RADJASA et al., 2011; SUDEK et al., 2007).

Diante destes resultados, as perspectivas em torno da bioprospecção marinha continuam avivadas, em especial, em torno dos processos metabólicos dos microrganismos marinhos, cada vez mais reconhecidos como a verdadeira rota de descoberta de novos fármacos marinhos (GERWICK e FENNER, 2013; SUBRAMANI e AALBERSBERG, 2013).

## 1.2 Microrganismos Marinhos

Os microrganismos do ambiente marinho, segundo o Censo da Vida Marinha (2010), são responsáveis por 90% da biomassa de toda a vida marinha e sua diversidade pode ser extrapolada para pelo menos dezenas ou centenas de milhões de tipos de microrganismos. Cosmopolitas como são, os microrganismos marinhos colonizam praticamente qualquer ambiente desse ecossistema, inclusive regiões de condições extremas de temperatura, salinidade e pressão (AUSUBEL, CRIST e WAGGONER, 2010; FENICAL e JENSEN, 2006).

Na última década, os microrganismos marinhos têm alcançado maior ênfase em torno da sua capacidade de sintetizar moléculas bioativas e aumentar o arsenal de compostos com potencial aplicação terapêutica, além de incorporar sustentabilidade ao processo de pesquisa e desenvolvimento de fármacos de origem marinha. É sabido que, muitas moléculas interessantes de fontes marinhas, em particular de invertebrados marinhos, não receberam a atenção merecida pela indústria farmacêutica devido às preocupações com o suprimento econômico e independente das coletas ameaçadoras para a população destes organismos (FENICAL e JENSEN, 2006; HILL e FENICAL, 2010). Além disto, essa ênfase também se deve a percepção de que muitas substâncias previamente isoladas de macrorganismos, como esponjas e ascídias, são, na verdade, produtos metabólicos dos microrganismos simbiotes (GERWICK e FENNER, 2013; PIEL, 2009).

O potencial biotecnológico dos microrganismos aparenta ser praticamente ilimitado. Um único microrganismo pode fornecer vários compostos bioativos diferentes quando submetido a diferentes condições de fermentação e, mais além, com o incremento das mais recentes técnicas genômicas e análises das vias metabólicas, abrir um leque de múltiplas vias crípticas induzíveis para a produção de várias outras moléculas orgânicas (HILL e FENICAL, 2010).

Essa diversidade tem, então, atraído diversos estudos ao redor do mundo incluindo fungos, cianobactérias marinhas e diversos outros grupos de eubactérias em pesquisas sobre sua biodiversidade e potencial químico, ecológico e biotecnológico. A procura por esses recursos tem se originado das mais diversas fontes, como sedimentos, águas rasas e profundas, superfícies animadas e inanimadas, e a partir do interior dos tecidos de macrorganismos (GERWICK e MOORE, 2012; WILLIAMS, 2009).

Contudo, ainda mais esforços serão necessários para uma exploração mais efetiva desse tipo de recurso, considerando a estimativa de que menos de 1% dos microrganismos

podem ser cultivados, e que a aplicação de métodos independentes de cultivos e abordagens moleculares têm constatado que muitas cepas predominantes permanecem sem qualquer ou apenas alguns exemplares cultivados (AMANN, LUDWIG e SCHLEIFER, 1995; GERWICK e MOORE, 2012; PHAM e KIM, 2012).

Deste modo, microbiologistas, ecólogos, biólogos evolucionistas e químicos tem atentado cada vez mais para metabolismo secundário singular dos microrganismos marinhos, em especial, fungos, bactérias e cianobactérias marinhas devido ao seu potencial biotecnológico promissor (IMHOFF, LABES e WIESE, 2011). Esse interesse tem inspiração na importância histórica dos microrganismos terrestres como exímios produtores de moléculas com atividade biológica, seja contra outros microrganismos ou contra estados fisiológicos de diversas doenças. Tais substâncias bioativas são largamente utilizadas como antibióticos, como no tratamento de múltiplas infecções bacterianas (penicilinas, cefalosporinas, estreptomicina e vancomicina), além de se mostrarem muito eficazes contra carcinomas (bleomicina, dactinomicina, doxorubicina e estaurosporina), podendo também agir como imunossupressores (ciclosporina) viabilizando, por exemplo, o transplante de órgãos (BHATNAGAR e KIM, 2010). Diante dos bem sucedidos exemplos de fontes terrestres, a pesquisa com produtos naturais de microrganismos marinhos vem dando seus primeiros, e firmes, passos, com moléculas em estudos clínicos que vem se mostrando fortes candidatas a serem os novos medicamentos de origem marinha (BHATNAGAR e KIM, 2010).

### 1.2.1 Actinomicetos

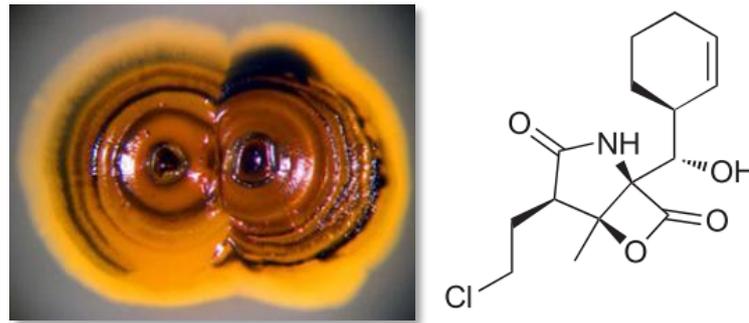
Estima-se que mais de 33.000 metabólitos secundários bioativos já foram isolados de microrganismos desde 1940 a 2010, destes aproximadamente 40% tem como fonte bactérias da ordem *Actinomycetales*, também conhecidas como actinomicetos (BÉRDY, 2012). Tais bactérias gram-positivas e de crescimento filamentosos, são célebres fontes de diferentes compostos com diversas atividades farmacológicas. Desde que começaram a serem explorados, na década de 50, os actinomicetos ocupam lugar de destaque na produção de novos metabólitos com importância terapêutica e farmacológica e, atualmente, permanecem como alvos de diversos estudos de prospecção de produtos naturais marinhos (FENICAL e JENSEN, 2006; MIAO e DAVIES, 2010; ZOTCHEV, 2012).

A ocorrência dos actinomicetos, de início amplamente relatada para solos terrestres, tem sido estendida para diversos ecossistemas marinhos, desde os sedimentos, rasos

ou de grandes profundidades, até a superfície de invertebrados marinhos, como esponjas e tunicados (OLANO, MÉNDEZ e SALAS, 2009; SUBRAMANI e AALBERSBERG, 2013; ZOTCHEV, 2012). Foram os actinomicetos terrestres, em especial do gênero *Streptomyces*, os primeiros a serem estudados e, logo, os primeiros a renderem substâncias bioativas que se tornaram medicamentos, em especial antibióticos e antitumorais, até hoje usados na clínica. A estreptomicina, por exemplo, foi o primeiro antibiótico derivado de estreptomicetos, foi também o primeiro representante da classe dos aminoglicosídeos isolado de *Streptomyces griseus*, e é utilizado ainda hoje no tratamento de infecções bacterianas (MIAO e DAVIES, 2010).

Recentemente, os olhares das pesquisas em produtos naturais marinhos têm se inclinado para os actinomicetos isolados de mares e oceanos, em razão do reconhecimento de que estes microrganismos apresentam singulares adaptações metabólicas para a colonização deste tipo de ambiente. Adicionalmente, a vastidão do ambiente marinho sustenta as expectativas de que a diversidade dos actinomicetos que lá habitam seja maior que a atualmente conhecida. A descoberta de um novo gênero de actinomiceto marinho, nomeado *Salinispora*, em 2005 por Maldonado e colaboradores, cujo crescimento é obrigatoriamente dependente de íons sódio (MALDONADO, FENICAL, et al., 2005), seguida da identificação de pelo menos seis novas famílias de actinomicetos, incluindo bactérias do gênero *Streptomyces*, é exemplo de como as fronteiras do conhecimento sobre estes microrganismos ainda podem ser alargadas (FENICAL e JENSEN, 2006).

Outro resultado marcante dos referidos estudos foi a descoberta da salinosporamida A (NPI-0052) a partir do actinomiceto marinho *Salinispora tropica* (figura 2), isolada do sedimento de profundidade coletado em Bahamas. Esta  $\beta$ -lactona inédita mostrou potente efeito citotóxico por meio da inibição seletiva e irreversível da função catalítica dos proteossomos, complexos proteicos responsáveis pela degradação de proteínas no interior das células e já reconhecidos como alvo quimioterápico do câncer (FELING et al., 2003; GIDDINGS e NEWMAN, 2013). O ingresso na fase I de testes clínicos com a salinosporamida A ocorreu apenas três anos após a sua descoberta, em 2003, e é nesta fase que ela se encontra atualmente, sendo avaliada no tratamento de vários tumores sólidos, linfoma e mieloma múltiplo. Este autêntico produto natural marinho é o primeiro candidato para o tratamento de câncer obtido da fermentação salina de um actinomiceto marinho-restrito (SUBRAMANI e AALBERSBERG, 2012).



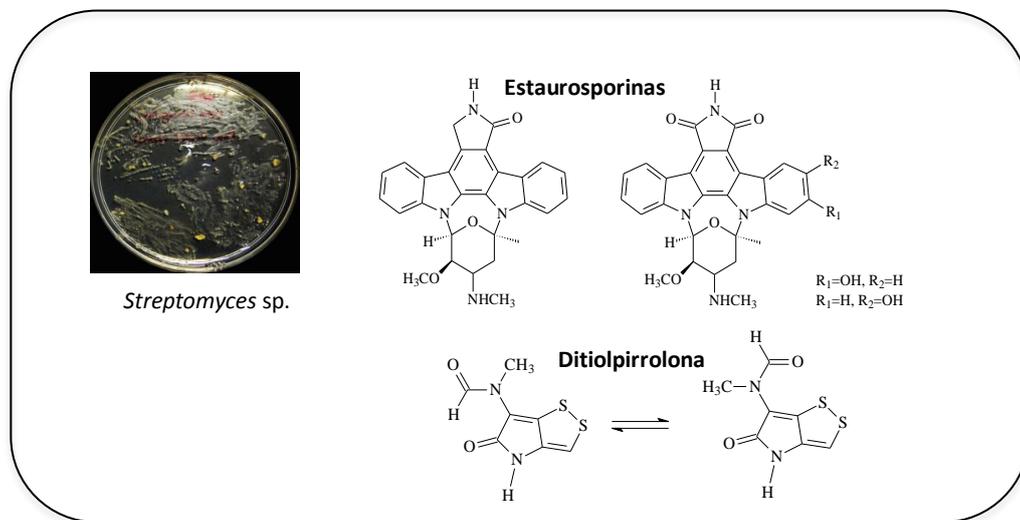
**Figura 2.** *Salinispora tropica* e o composto antitumoral isolado do seu extrato, Salinosporamida A.

### 1.2.2 Estudos no Litoral Cearense

Os mares brasileiros se estendem por cerca de 8.500 km de litoral e representam um grande potencial para a descoberta de substâncias de interesse médico e farmacológico. Inserido neste contexto, está o Nordeste do Brasil, composto por nove Estados, todos eles banhados pelas águas do Oceano Atlântico. No estado do Ceará, a zona costeira de aproximadamente 573 km despertou o interesse dos grupos de pesquisas que estudam produtos naturais marinhos. A investigação do potencial farmacológico das espécies de organismos que habitam o litoral cearense tem sido objetivo do nosso grupo de estudos há cerca de dez anos. Inicialmente, os esforços foram concentrados em invertebrados marinhos tais como esponjas, ascídias e cnidários (FERREIRA et al., 2011; JIMENEZ et al., 2003, 2004, 2008, 2012; TAKEARA et al., 2007, 2008; WILKE et al., 2009, 2010) e mais recentemente, nos microrganismos associados aos invertebrados ou ao sedimento das praias cearenses (ANDRÉO et al., 2012; ARTHAUD et al., 2012; JIMENEZ et al., 2013; SOUSA et al., 2012).

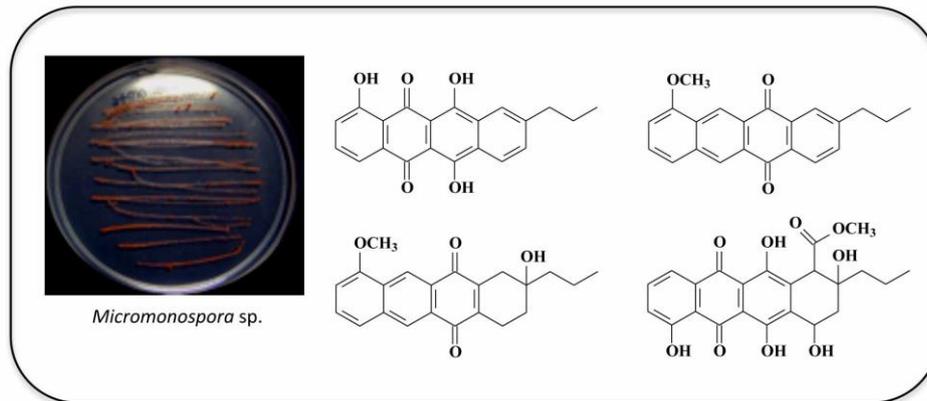
A identificação de derivados da estaurosporina, substância tipicamente relacionada ao metabolismo secundário de actinomicetos, no extrato da ascídia *Eudistoma vancouveri* motivou os estudos prospectivos da sua microbiota associada (JIMENEZ et al., 2012). Numa primeira investida foram isoladas 84 cepas de microrganismos associados à ascídia *E. vancouveri* coletada na Praia da Taíba, no município de São Gonçalo do Amarante, Ceará, sendo que 17 delas foram selecionadas para avaliação de atividade citotóxica dos respectivos extratos brutos obtidos do caldo de crescimento. A partir da triagem para atividade citotóxica em três linhagens celulares tumorais, extrato bruto obtido do caldo de crescimento da cepa denominada Eva 01063 apresentou-se o mais ativo. A identificação molecular dessa cepa, realizada pelo sequenciamento do DNA que codifica o gene rRNA 16S,

revelou tratar-se de um actinomiceto do gênero *Streptomyces* sp. A análise do extrato da bactéria por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a um espectrômetro de massas (UPLC-ESI-MS/MS) demonstrou a presença de estaurosporina, mas não dos derivados isolados da ascídia (figura 3) (ANDRÉO et al., 2012). O fracionamento bioguiado deste extrato, entretanto, levou ao isolamento de uma ditiolpirrolona com potente atividade citotóxica em células de tumor metastático de próstata. Esta substância foi capaz de bloquear a citocinese destas células, resultando na realização do processo de apoptose (ABREU et al., 2013).



**Figura 3.** Compostos bioativos obtidos a partir do extrato do actinomiceto marinho *Streptomyces* sp. isolado da ascídia *Eudistoma vannamei* (ANDREO et al., 2012; ABREU et al., 2013).

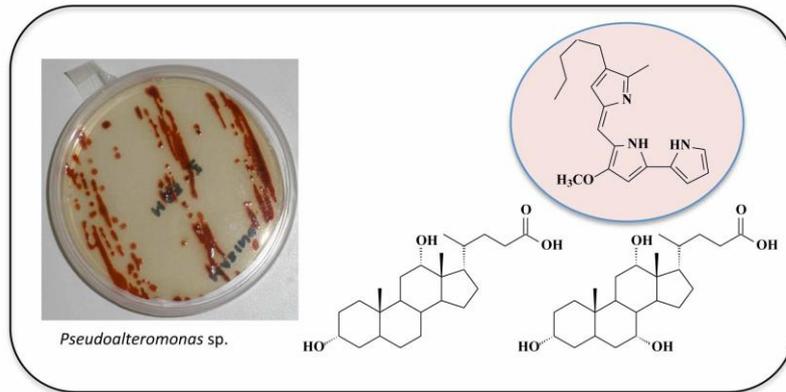
Exemplares de *E. vannamei* foram outra vez coletados no mesmo local para novo estudo. Nesta segunda investida foram isoladas 20 cepas, sendo 11 destas selecionadas para avaliação da atividade citotóxica dos respectivos extratos brutos obtidos de caldo de crescimento. Dentre as cepas avaliadas, quatro se mostraram bastante citotóxicas e a respectiva identificação molecular revelou que se tratavam de actinomicetos do mesmo gênero, *Micromonospora* (JIMENEZ et al., 2013). O estudo químico de uma destas cepas levou ao isolamento de quatro novos derivados de antraciclinas (figura 4), moléculas reconhecidas pelo seu potencial anticâncer (SOUSA et al., 2012).



**Figura 4.** Antraciclina obtida da bactéria *Micromonospora* sp. isolada de *Eudistoma vannamei* (SOUSA et al., 2012).

Considerando a abundante microbiota que o sedimento marinho abriga, estudos com amostras de sedimentos coletados novamente na Praia da Taíba, foram iniciados. No total, 32 cepas de microrganismos foram recuperadas, das quais 13 tiveram seus extratos brutos avaliados para a atividade citotóxica. O extrato de uma bactéria Gram-negativa com coloração vermelha intensa revelou a maior atividade citotóxica, com valores de  $CI_{50}$  variando de 0,04  $\mu\text{g/mL}$ , em células leucêmicas HL60, a 0,26  $\mu\text{g/mL}$ , em células de melanoma humano MDA MB-435. A bactéria foi identificada como *Pseudoalteromonas* sp. e o fracionamento bioguiado do seu extrato levou ao isolamento da prodigiosina (figura 5), um pigmento vermelho tripirrólico, previamente isolado de cepas de *Serratia* sp., e já reconhecido por suas atividades imunoestimulante e antitumoral. Em adição ao isolamento da prodigiosina, como o princípio ativo, dois ácidos biliares, o ácido deoxicólico e o ácido cólico (figura 5), foram isolados de frações não ativas.

Experimentos adicionais com células tumorais de mama transformadas para superexpressão do receptor ErbB2, que é superexpresso em cerca de 25-30% em todos os cânceres de mama e associado ao difícil prognóstico, demonstraram que a prodigiosina foi capaz de atuar seletivamente em células com diferentes padrões de expressão. A prodigiosina demonstrou moderada atividade contra a linhagem parental HB4a, com  $CI_{50}$  de 4,6  $\mu\text{g/mL}$ , sendo 115 e 18 vezes mais ativa para as linhagens com moderada superexpressão HB4a-C3.6 ( $CI_{50}$  de 0,04  $\mu\text{g/mL}$ ) e com alta superexpressão HB4a-C5.2 ( $CI_{50}$  de 0,26  $\mu\text{g/mL}$ ), respectivamente. Estes dados sugerem que esta molécula pode desempenhar um papel importante no reconhecimento diferencial de subtipos de tumores de mama, cujas implicações terapêuticas são bastante relevantes (ARTHAUD et al., 2012).



**Figura 5.** Metabólitos secundários obtidos da bactéria *Pseudoalteromonas* sp. isolada do sedimento da Praia da Taíba. No detalhe, molécula da prodigiosina. (ARTHAUD et al., 2012).

Os resultados aqui apresentados embasam o promissor potencial biomédico abrigado pelos microrganismos do litoral cearense e estimulam a continuidade dos estudos a cerca da prospecção de produtos naturais marinhos com potencial anticâncer, agora melhor fundamentado pela diversidade de bactérias ali encontradas. No presente trabalho, realizou-se a prospecção de substâncias com potencial anticâncer do sedimento da Praia da Pedra Rachada, no município de Paracuru, litoral oeste do estado do Ceará.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

- Realizar a prospecção de substâncias com potencial anticâncer a partir de actinomicetos isolados do sedimento da Praia da Pedra Rachada, no município de Paracuru.

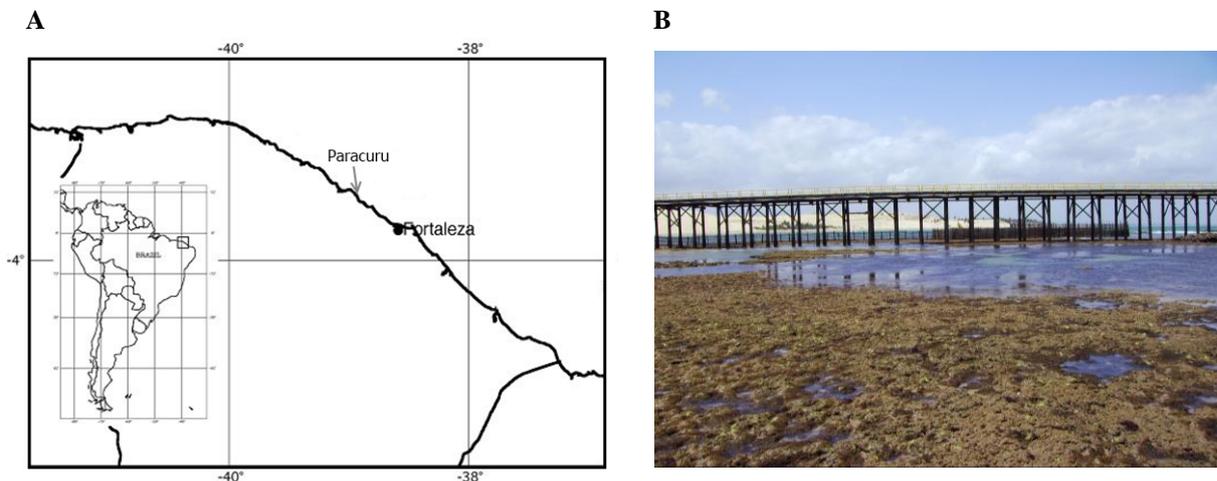
### 2.2 Objetivos específicos

- Cultivar e catalogar os actinomicetos isolados a partir do sedimento coletado;
- Preparar extratos orgânicos a partir dos fermentados biológicos dos actinomicetos e avaliar as respectivas atividades antitumorais *in vitro*;
- Realizar o fracionamento do extrato mais ativo utilizando, para isso, diferentes técnicas cromatográficas;
- Isolar e reconhecer os metabólitos secundários com atividade citotóxica do extrato mais ativo;
- Avaliar o efeito do composto da cepa mais ativa sobre a proliferação de células de melanoma metastático MALME-3M em cultura.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Coleta do Material e Cultivo dos Microrganismos

A amostra de sedimento marinho foi coletada durante a maré baixa na praia da Pedra Rachada ( $03^{\circ}23'S$ ;  $39^{\circ}54'O$ ), pertencente ao município de Paracuru (figura 6). O material foi armazenado em tubo Falcon estéril, e posteriormente conservado a  $-20^{\circ}C$  até o seu devido processamento.

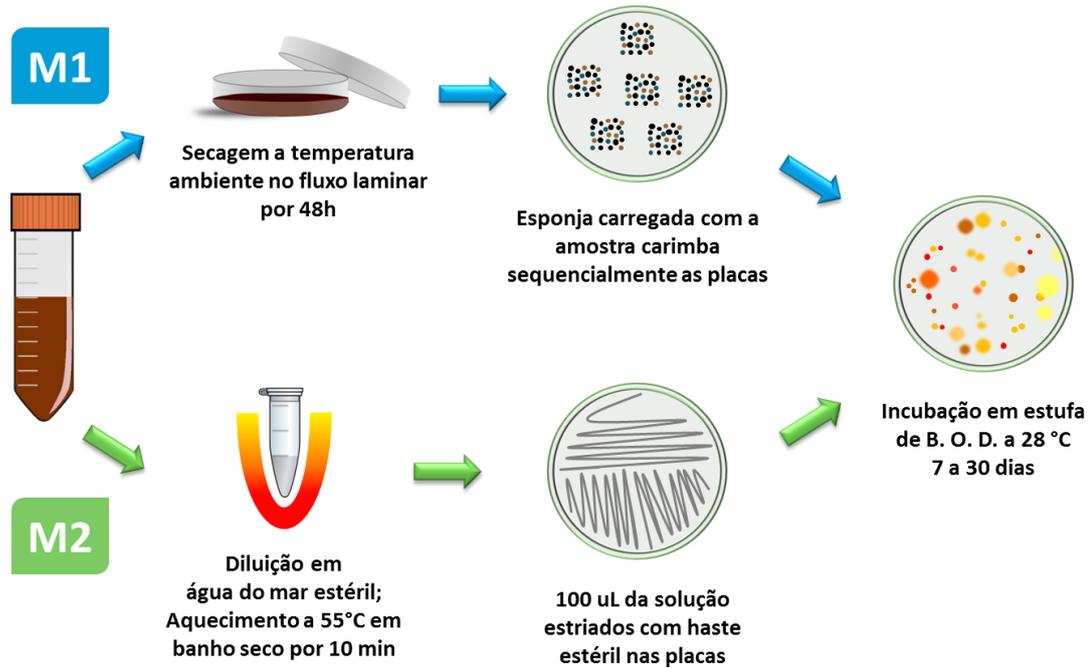


**Figura 6.** A, Mapa com a localização do ponto de coleta do material, no município de Paracuru, a aproximadamente 84 km ao noroeste da cidade de Fortaleza. B, fotografia do local de coleta durante a maré baixa (por Diego Wilke).

O sedimento coletado foi processado em câmara de fluxo laminar unidirecional (Filtracom, modelo MiniFlow I) seguindo dois métodos, que estão ilustrados na figura 7. Para o primeiro método (M1), separou-se uma porção do sedimento em uma placa de Petri estéril e deixou-se secar por 48 horas no interior do fluxo laminar. Após esse período, com uma rolha de esponja previamente esterilizada, carimbou-se o sedimento e, em seguida, carimbaram-se as placas de Petri contendo diferentes meios de cultura.

No segundo método (M2), uma pequena porção do sedimento foi colocada em um microtubo contendo 1mL de água do mar filtrada e estéril, que foi aquecido a  $55^{\circ}C$  em banho seco, durante 10 minutos. Posteriormente, o preparado foi homogeneizado e, para cada placa de cada meio de cultura, alíquotas de  $100\ \mu L$  foram estriadas com haste estéril em toda a superfície da placa. As placas seguiram para incubação em estufa incubadora de B.O.D.

(CIENTEC, modelo CT-708) a 28 °C por, no mínimo, sete dias, podendo lá permanecer por até 30 dias.



**Figura 7.** Métodos empregados no isolamento das bactérias do sedimento da Praia da Pedra Rachada, Paracuru, Ceará.

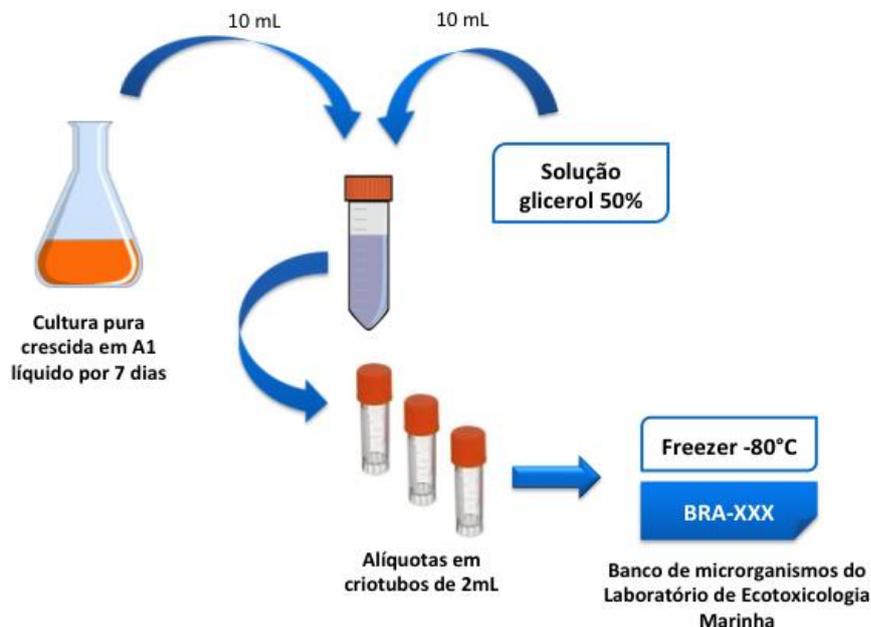
Três tipos diferentes de meios de cultura foram utilizados nesse plaqueamento inicial. O meio ágar amido-caseína (SCA) foi preparado como sugerido no rótulo (HIMEDIA). O meio ágar minerais traços (TMA) foi formulado em laboratório e consiste de glicose, extrato de levedura,  $K_2HPO_4$ ,  $Na_2HPO_4$ ,  $KNO_3$ ,  $NaCl$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  e  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , e uma solução de metais traços, contendo  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ ,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ,  $CoSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $H_3BO_3$ ,  $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$  em água destilada com 18% de ágar. Por fim, o meio ágar água do mar (SWA) também foi formulado em laboratório e consiste de água do mar filtrada diluída a 75% em água destilada e 18% de ágar. A todos os meios sólidos foi acrescido ciclo-heximida 100 µg/mL.

As colônias selecionadas foram reconhecidas por suas diferenças fenotípicas (cor, brilho, forma e textura) características dos actinomicetos e inoculadas em uma nova placa. A purificação do cultivo dos microrganismos isolados foi realizada através de repiques sucessivos utilizando a técnica de esgotamento por estrias, em placas com meio sólido A1, que foi formulado em laboratório e consiste de amido solúvel, extrato de levedura e peptona (BD Biosciences), em água do mar filtrada diluída a 75% em água destilada e 18% de ágar.

Uma vez purificada, cada cepa foi inoculada a partir do meio sólido meio A1 líquido de onde se procedeu a criopreservação do microrganismo (item 3.1.1 a seguir) e a extração do caldo para obtenção dos extratos brutos (item 3.2 adiante).

### 3.1.1 Preservação dos microrganismos isolados

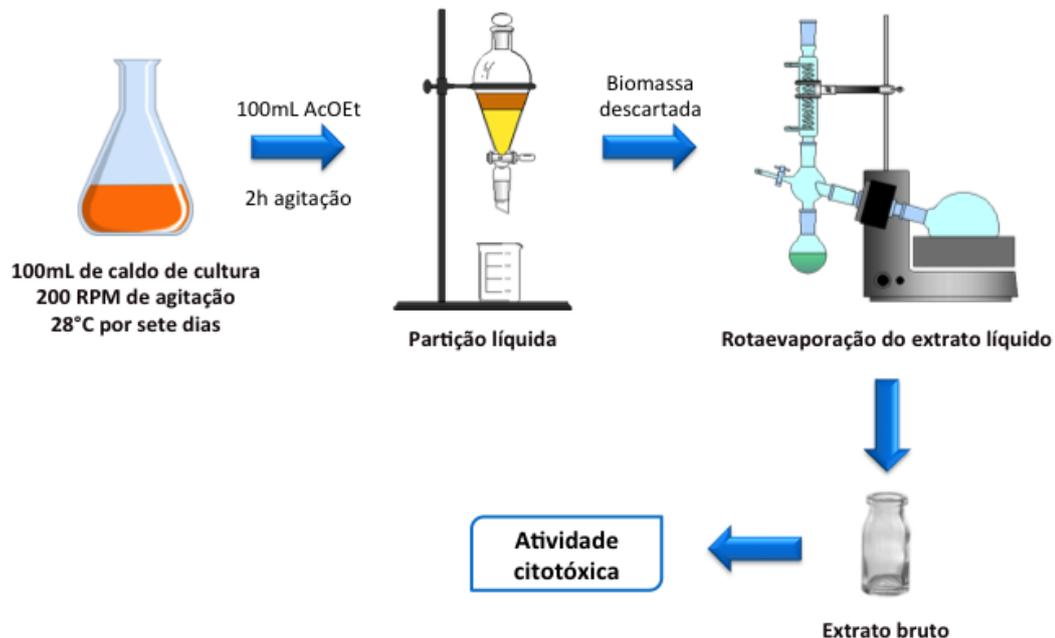
Cada cepa de microrganismo isolada do sedimento coletado foi preservada a -80°C utilizando como agente protetor o glicerol. A partir da cultura líquida crescida por sete dias, 10 mL do fermentado foram aliqotados em tubo Falcon estéril e adicionaram-se 10 mL de solução glicerol 50% (Dinâmica), diluído em água destilada previamente autoclavada. Em seguida, esta solução foi aliqotada em frascos criogênicos de 2 mL, que foram, então, estocados em freezer -80 °C (MDF-U54VC, Sanyo). Neste momento, a cepa congelada passou a compor o banco de microrganismos do Laboratório de Ecotoxicologia Marinha e foi batizada com o código BRA seguido da numeração subsequente do banco. Esse processo está ilustrado na figura 8.



**Figura 8.** Método empregado na criopreservação das bactérias recuperadas do sedimento da Praia da Pedra Rachada, Paracuru, Ceará.

### 3.2 Obtenção dos Extratos Brutos

Primeiramente, as culturas puras foram inoculadas para Erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL de caldo A1 e mantidos a 200 RPM de agitação (TECNAL, TE-245) e 28°C por sete dias. Após esse período, os caldos de cultura foram extraídos com o solvente acetato de etila (AcOEt), numa proporção de 1:1, sob agitação durante duas horas. Em seguida, o conteúdo de cada frasco foi filtrado em funil de separação, a biomassa resultante foi descartada e os extratos líquidos foram rotaevaporados para remoção do solvente e obtenção do extrato bruto (Figura 9). Após este processo, o extrato foi avaliado quanto à sua atividade citotóxica em células tumorais em cultura pelo ensaio do MTT (detalhado no item 3.4.2 adiante).



**Figura 9.** Método empregado na obtenção dos extratos do caldo de fermentação das bactérias recuperadas do sedimento da Praia da Pedra Rachada, Paracuru, Ceará.

O extrato bruto que mostrou o maior potencial de inibição quando testado em dose única de 50µg/mL, proveniente da BRA-090, foi selecionado para crescimento em larga escala. Para tanto, a cepa BRA-090 foi crescida em Erlenmeyers de 2 L contendo 700 mL de meio líquido A1T durante sete dias, a 200 RPM de agitação e 28°C. Posteriormente, os 14 L de fermentado foram extraídos e o extrato AcOEt foi concentrado, resultando na obtenção de 570 mg de extrato bruto.

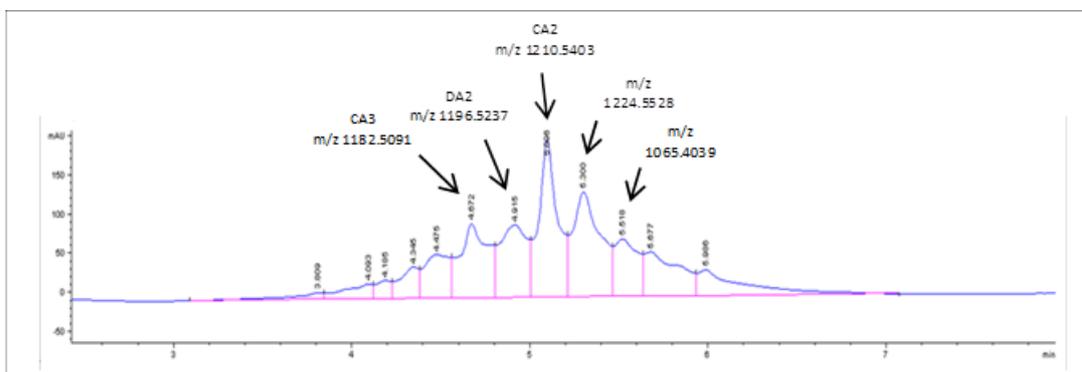
Este extrato foi submetido à desrepliação utilizando espectrometria de massas e comparação das massas em banco de dados de produtos naturais marinhos, como orientação para o fracionamento químico. Estes procedimentos foram realizados em parceria com o *Centro de Excelencia en Investigación de Medicamentos Innovadores en Andalucía*, da Fundação Medina, na Espanha, pela Dra. Thiciana Sousa sob orientação do Dr. Fernando Reyes.

### 3.3 Desrepliação e Fracionamento Químico

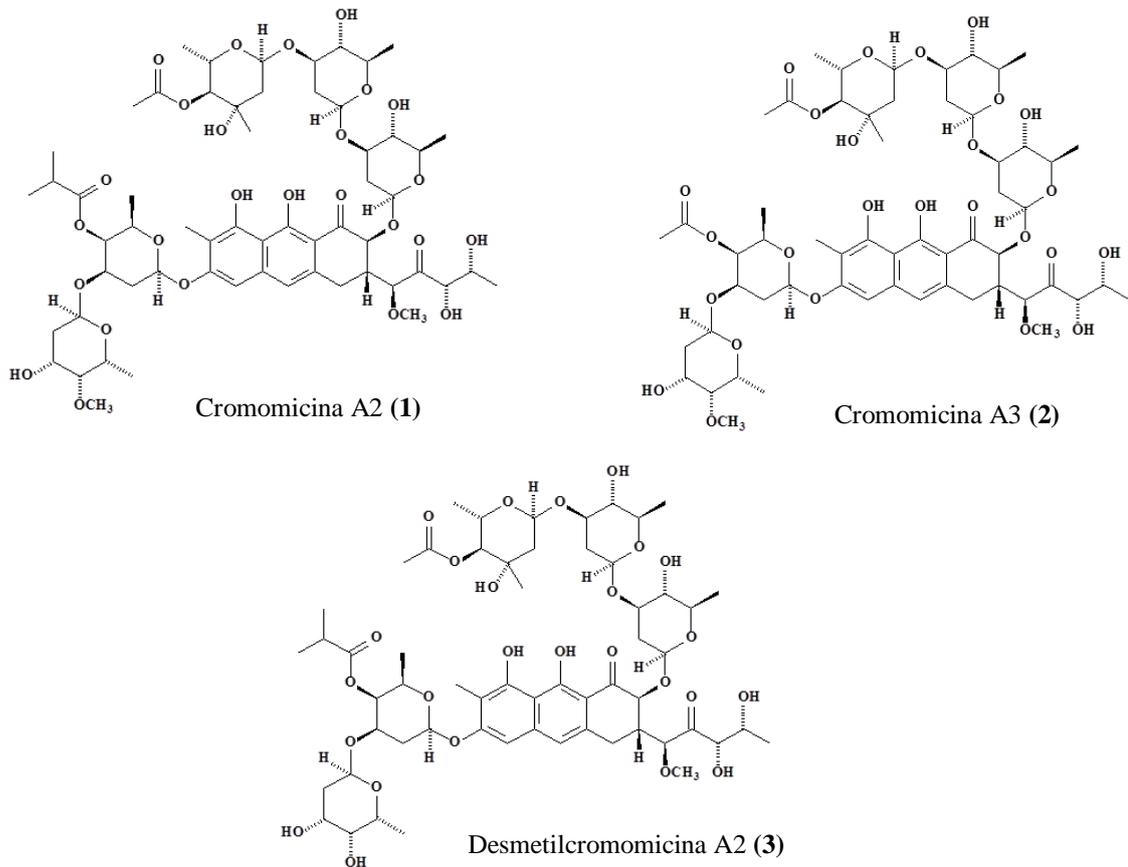
O extrato AcOEt (570 mg) foi solubilizado em 2 mL da mistura MeOH:DMSO 1:1 e fracionado por cromatografia *flash* utilizando o equipamento CombiFlash, equipado com cartucho C18. Utilizou-se método gradiente MeOH/H<sub>2</sub>O 20-100% em 30 minutos, fluxo de 10 mL/min, resultando em 15 frações (F1-F15) de 18 mL cada.

As frações F1-F15 foram novamente analisadas por Cromatografia Líquida de alta eficiência acoplada a um Espectrômetro de Massas (LC/MS) e as massas encontradas foram comparadas ao banco de dados interno da Fundação Medina.

A desrepliação da fração F8 (figura 10) mostrou picos com massas condizentes com compostos pertencentes à classe das cromomicinas, sendo possível identificar as cromomicinas A2 ( $m/z$  1210,5303), A3 ( $m/z$  1182,5091) e a desmetilcromomicina A2 ( $m/z$  1196,5237), representadas na figura 11. Além disso, foram verificados dois picos em  $m/z$  1224.5528 e 1065.4039, cujas massas não foram encontradas na literatura, sugerindo que se tratam de novos compostos.



**Figura 10.** Desrepliação da fração F8 do extrato bruto da BRA-090.



**Figura 11.** Estruturas das cromomicinas identificadas por LC-MS.

A fração F8 foi cromatografada por CLAE semi-preparativo utilizando coluna C18, método gradiente ACN (0,01% TFA):H<sub>2</sub>O (0,01%) 30-70% em 40 minutos e fluxo de 20 mL/min, resultando em 80 frações de 7 mL cada. A fração F33 foi recromatografada por CLAE, utilizando coluna C8, método gradiente ACN (0,01% TFA):H<sub>2</sub>O (0,01%) 50-56% em 40 minutos e fluxo de 3,6 mL/min. Foram coletadas 44 frações de 2 mL cada. A reunião das frações 15 e 16 culminou no isolamento de 1,0 mg de um sólido amarelo. A comparação do espectro de RMN <sup>1</sup>H desta substância com os encontrados na literatura, bem como a fragmentação sequencial MS/MS permitiram determiná-la como sendo a cromomicina A2 (C-A2, **1**).

### 3.4 Avaliação da Atividade Citotóxica *in vitro*

#### 3.4.1 Cultivo das células

As linhagens celulares utilizadas nos experimentos de avaliação da atividade citotóxica estão listadas na tabela 2 com especificações quanto à procedência e ao tipo histológico.

As células foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (Corning, 25 cm<sup>2</sup>, volume de 50 mL ou 75 cm<sup>2</sup>, volume de 250 mL) utilizando o meio de cultura RPMI 1640 (Gibco) complementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (100 U/mL penicillina e 100 µg/mL estreptomicina), com exceção da linhagem MALME-3M, para a qual o meio IMDM (Gibco) complementado com 20% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (100 U/mL penicillina e 100 µg/mL estreptomicina) foi utilizado.

As culturas foram manuseadas em câmaras de fluxo laminar vertical (ESCO, modelo Airstream classe II-B2; VECO, modelo Biosafe 12 classe II) e mantidas em incubadoras de CO<sub>2</sub> a 37 °C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> (SAYNO, modelo MCO-19AIC; NUAIRE, modelo TS Autoflow). O crescimento das culturas foi acompanhado diariamente com auxílio de microscópio óptico invertido (LABOMED, modelo TCM 400; Nikon, modelo Diaphot) e o repique para meio de cultura novo foi feito quando necessário. Para o desprendimento das células aderidas utilizou-se uma solução de tripsina-EDTA 0,5% (Gibco) diluída 10X em PBS (FRESHNEY, 2005).

**Tabela 2.** Linhagens celulares utilizadas no ensaio de citotoxicidade *in vitro* cedidas pelo NCI-USA (*National Cancer Institute, Bethesda, EUA*) ou obtidas do ATCC (*American Type Culture Collection*).

Linhagem Celular	Tipo Histológico	Procedência	Concentração de plaqueamento (cél/s/mL)
HCT-116	Carcinoma de cólon	ATCC	0,5 x 10 <sup>5</sup>
HL-60	Leucemia promielocítica	NCI-USA	0,3 x 10 <sup>6</sup>
K562	Leucemia mielóide crônica	NCI-USA	0,1 x 10 <sup>6</sup>
MALME-3M	Melanoma metastático	ATCC	0,5 x 10 <sup>5</sup>
OVCAR-8	Carcinoma ovariano	NCI-USA	0,1 x 10 <sup>6</sup>
PC-3M	Carcinoma prostático metastático	NCI-USA	0,5 x 10 <sup>5</sup>
SF-295	Glioblastoma	NCI-USA	0,1 x 10 <sup>6</sup>
MRC-5	Fibroblastos de pulmão fetal	ATCC	0,5 x 10 <sup>5</sup>

### 3.4.2 Ensaio do MTT

O ensaio do MTT pode ser utilizado para quantificação indireta das células viáveis através de uma análise colorimétrica da atividade da enzima succinil-desidrogenase presente nas mitocôndrias ativas das células vivas (MOSMANN, 1983), que se baseia na redução do sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazolina bromida (MTT), um composto de cor amarela, a formazan, de coloração púrpura, cuja absorvância pode, então, ser mensurada em espectrofotômetro. Neste estudo, o ensaio do MTT foi utilizado para rastrear e monitorar a atividade citotóxica dos extratos brutos das bactérias e da C-A2, em diversas linhagens celulares. Para a realização dos ensaios, as células foram plaqueadas 24 horas antes da adição da amostra teste em placas de 96 cavidades na densidade descrita na tabela 2.

Em uma análise inicial, as amostras foram diluídas em dimetilsulfóxido, DMSO (Sigma), e testadas quanto ao seu efeito antiproliferativo em células de carcinoma de cólon humano HCT-116 após 72 horas de incubação, na concentração de 50 µg/mL, em duplicata. As amostras selecionadas seguiram para avaliação do efeito utilizando diluições seriadas em duplicatas de concentrações variando de 0,016 a 50 µg/mL. A C-A2, por sua vez, foi testada no painel de linhagens da tabela 2, em concentrações crescentes de 0,032 a 50 nM (HL-60, OVCAR8, SF-295) ou 412,88 nM (HCT-116, MALME-3M, PC-3M e MRC-5), incubada juntamente com a suspensão de células em volume final de 200 µL durante 24, 48 ou 72 h, em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C.

Três horas antes do término do tempo de incubação, o sobrenadante foi descartado e, em seguida, 150 µL da solução de MTT (Sigma) a 5 mg/mL em meio RPMI 1640 foi adicionado a cada poço da placa, que foi reincubada por mais 3 horas. Após esse período, o sobrenadante foi descartado e o precipitado de cada poço foi ressuspensionado em 150 µL de DMSO e agitado até sua completa dissolução, quando pôde, então, ter as absorvâncias lidas em espectrofotômetro de placa (Fisher Scientific, modelo Multiskan FC) no comprimento de onda de 595 nm.

Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos erros-padrão. Para as amostras testadas em duplicatas de dose única, a porcentagem de inibição do crescimento celular foi obtida a partir da média dos valores de absorvância convertidos em porcentagem, relativa ao controle. Para as amostras testadas em diluições seriadas, também em duplicatas, um gráfico absorvância x concentração foi plotado para determinação da concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo (CI<sub>50</sub>) e seus

respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%) a partir de regressão não-linear no programa GraphPad Prism (GraphPad Software versão 5.0).

### **3.5 Análise dos Efeitos de C-A2 sobre Células MALME-3M**

Para os estudos do mecanismo de ação da C-A2, utilizou-se as células da linhagem de melanoma metastático MALME-3M. Para os ensaios descritos a seguir, as células MALME-3M foram plaqueadas em placas de 24 poços, na concentração de  $5 \times 10^4$  células/mL, e incubadas com C-A2 nas concentrações de 10, 20, 30 e 40 nM por 48 horas. O controle negativo constituiu-se de células tratadas com DMSO (Sigma) 0,4%, e a doxorubicina (Sigma) a 100 nM foi utilizada como controle positivo.

#### **3.5.1 Avaliação da atividade antiproliferativa e análise morfológica por microscopia óptica**

##### *3.5.1.1 Exclusão pelo azul de Trypan*

O ensaio com azul de Trypan permite a distinção individual das células viáveis das não viáveis, uma vez que este corante é capaz de penetrar em todas as células, porém apenas as células viáveis conseguem bombear o azul de Trypan para fora, diferenciando-se das células mortas, que adquirem coloração azulada. Este ensaio permitiu contabilizar o crescimento das células MALME-3M tratadas com C-A2 e, dessa forma, avaliar o efeito antiproliferativo desta substância após 48 horas de incubação.

Após a incubação, as células foram lavadas com 200  $\mu$ L de PBS, desprendidas após adição de 150  $\mu$ L de tripsina-EDTA 0,25% e permanência de 3 minutos em estufa incubadora (37°C, atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>). Em seguida, foi retirada uma alíquota de 90  $\mu$ L da suspensão de células e adicionado 10  $\mu$ L do azul de Trypan (Sigma), e, desta suspensão, 10  $\mu$ L foram aliquoteados para uma câmara de Neubauer onde as células puderam ser diferenciadas e contadas em viáveis e não viáveis.

O número de células contadas em cada experimento foi expresso como a média  $\pm$  erro padrão da média de 2 experimentos independentes (realizados em duplicata). Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Dunnet, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

##### *3.5.1.2 Coloração por May-Griüwald-Giemsa*

A coloração por May-Grunwald-Giemsa baseia-se em interações eletrostáticas entre os corantes e moléculas-alvo. Essa coloração possui azul de metileno (corante básico), utilizado para marcar de azul as estruturas mais ácidas do núcleo; e eosina (corante ácido), para marcar em tons avermelhados os componentes mais básicos, como as estruturas citoplasmáticas (HOROBIN, 2011). Desta forma, este método foi utilizado para analisar a célula quanto a sua integridade nuclear, bem como alterações no citoplasma.

Células MALME-3M, na concentração de  $5 \times 10^4$  células/mL, foram plaqueadas em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares previamente esterilizadas em cada poço, e incubadas com C-A2 nas concentrações de 10, 20, 30 e 40 nM durante 48 horas. Após a incubação, as lamínulas foram imersas por 10 segundos no fixador (MeOH), em seguida foram imersas por mais 10 segundos em May-Grüwald e finalmente foram imersas por 10 segundos em Giemsa e visualizadas ao microscópio. Posteriormente, estas foram montadas em lâminas e fixadas com balsamo do Canadá.

As lâminas prontas foram levadas ao microscópico (Olympus, modelo BX41) para a avaliação qualitativa de suas características morfológicas e comparadas às células do controle negativo. Posteriormente as células foram fotografadas (câmera Olympus, modelo C-7070) para o registro das alterações observadas.

### 3.5.2 Estudos por citometria de fluxo

A técnica de citometria de fluxo permite investigar e classificar inúmeras alterações e características de eventos biológicos em células ou outras partículas microscópicas. O citômetro possui um feixe de luz (*laser*) que incide sobre as células, à medida que elas fluem individualmente sob um fluxo hidrodinâmico, permitindo a detecção dos sinais induzidos por cada célula. Os detectores são capazes de registrar desvios na dispersão linear (FSC, *Forward Scatter*) ou lateral (SSC, *Side Scatter*) da luz, além de captar a fluorescência emitida pelos marcadores utilizados, classificando cada célula ou partícula com um evento (GIVAN, 2004).

#### 3.5.2.1 Verificação da morfologia e viabilidade celular

Este método baseia-se na intensidade de dispersão da luz incidente sobre as células e na capacidade do iodeto de propídeo (PI, do inglês, *Propidium Iodide*) se ligar ao DNA apenas das células cuja membrana plasmática esteja rompida, como nos casos de apoptose tardia e necrose, emitindo alta fluorescência vermelha quando excitado pelo *laser*

(azul, neste caso, excitando a 488 nm). As células cuja membrana permanece íntegra emite uma fluorescência mais baixa, permitindo a diferenciação entre células viáveis e não viáveis.

Após a incubação, uma alíquota de 500 µL de suspensão de células tratadas e não tratadas foi transferida para um microtubo de centrifugação de 1,5 mL, centrifugados a 1500 RPM por 2 minutos (Hettich, modelo Universal 320R) e o pellet ressuspenso em 250 µL de uma solução de PI (Sigma) a 5 µg/mL diluído em PBS. Após 5 minutos de incubação as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (BD, modelo Accuri C6).

Cinco mil células foram contadas de cada replicata de cada grupo, com os fragmentos celulares omitidos da análise. As células foram dispostas quanto à sua dispersão linear, correlacionando ao seu volume, e dispersão lateral, correlacionando à sua granulosidade. A intensidade de emissão de fluorescência correlaciona com a integridade de membrana e esclarece a viabilidade celular. As porcentagens das células com membrana plasmática íntegra ou rompida foram analisadas usando marcadores para delimitar a população de células que predominava na região de fluorescência mais baixa e a população de células que predominava na região de fluorescência mais elevada, respectivamente, com base no controle negativo, usando o programa BD Accuri™ C6 Software versão 1.0.264.21. Os dados foram analisados a partir da média e dos respectivos erros padrão das médias de 2 experimentos, realizados em duplicata. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados em relação ao controle negativo por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Dunnet com nível de significância máximo de 5% ( $p < 0,05$ ) no programa GraphPad Prism.

#### 3.5.2.2 Análise do ciclo celular e fragmentação de DNA

Este método baseia-se na capacidade de ligação do PI ao DNA das células cujas membranas plasmáticas foram previamente rompidas, emitindo diferentes níveis de fluorescência vermelha quando excitado pelo *laser* (488 nm) e permitindo a suposição a cerca da fase do ciclo celular que uma célula se encontra (G0/G1, G2/M ou S) baseada no conteúdo de DNA que ela apresenta (2n, 4n ou uma situação intermediária, respectivamente). No caso de a intensidade de fluorescência emitida pelo PI mostra-se abaixo da referida para célula diploide (2n), pode-se considerar a existência de cromatina condensada e/ou DNA fragmentado (sub-G0/G1), por outro lado, se a intensidade de fluorescência saltar para além da característica de uma célula com DNA duplicado (4n), a ocorrência de células poliploides é presumível.

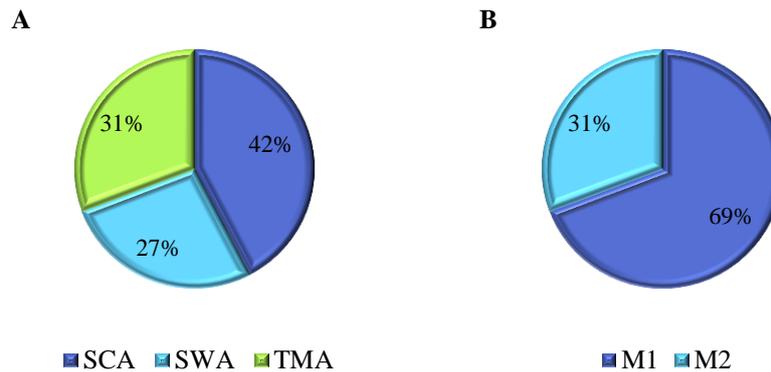
Após a incubação, uma alíquota de 500  $\mu\text{L}$  de suspensão de células tratadas e não tratadas foi transferida para um microtubo de centrifugação de 1,5 mL, centrifugados a 1500 RPM por 2 minutos (Hettich, modelo Universal 320R) e o pellet ressuspenso em 250  $\mu\text{L}$  de uma solução de PI (Sigma) a 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  diluído em PBS. Em seguida, 20  $\mu\text{L}$  de uma solução de Triton X-100 (0,1%) e citrato de sódio (0,1%) foram adicionados a tratamento e após incubação por 15 minutos na ausência de luz, as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (BD, modelo Accuri C6).

Cinco mil células foram contadas de cada replicata de cada grupo, com os fragmentos celulares omitidos da análise. Os dados foram analisados no programa no programa ModFit LT (Verity Software House) e os dados das percentagens de células em sub-G0/G1, G0/G1, S e G2/M foram determinados a partir das médias e dos erros padrão das médias de 2 experimentos em duplicata. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados em relação ao controle negativo por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Dunnet com nível de significância máximo de 5% ( $p < 0,05$ ) no programa GraphPad Prism.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Isolamento dos Microrganismos

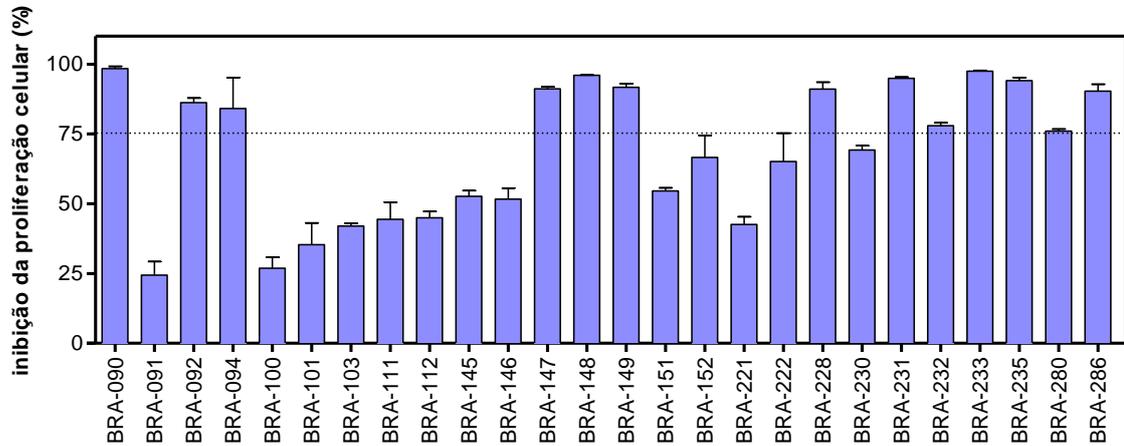
A partir da amostra de sedimento coletada na Praia da Pedra Rachada (Paracuru-CE), 26 cepas de microrganismos foram isoladas com base em suas características semelhantes às de actinomicetos. O meio SCA se mostrou como o que melhor favoreceu o isolamento destes microrganismos, com o total de 11 cepas, seguido pelo meio TMA com oito e pelo SWA com sete, cujas respectivas porcentagens estão apresentadas na figura 12A. Com relação ao método de isolamento, o M1 foi o mais eficiente, promovendo o isolamento de mais de 60% das cepas (figura 12B).



**Figura 12.** Distribuição das 26 cepas isoladas do sedimento da Praia Rachada (Paracuru-CE) quanto ao método (A) e ao meio de cultura (B) de isolamento. M1, método 1, sedimento foi seco e carimbado com rolinha de esponja estéril em placas de ágar; M2, método 2, porção do sedimento foi suspensa em água do mar estéril, aquecido a 55°C e estriado em placas de ágar. SCA, amido-caseína; SWA, água do mar; TMA, ágar minerais traços.

Em análise inicial, os extratos brutos obtidos dos 26 actinomicetos isolados foram testados sobre células HCT-116 após 72h de exposição à concentração única de 50 µg/mL. Destes, 13 inibiram o crescimento celular em pelo menos 75% e foram considerados ativos, como mostrado na figura 13. A maior inibição do crescimento celular partiu do extrato da cepa BRA-090, com 98,38%. Adotando uma perspectiva menos conservadora, outros 3 extratos, aqueles obtidos das cepas nomeadas BRA-152, BRA-222 e BRA-230, inibiram

acima de 65% do crescimento celular também foram considerados ativos e incluídos nas análises posteriores.



**Figura 13.** Inibição do crescimento de células HCT-116 dos extratos brutos obtidos dos actinomicetos isolados da Praia da Pedra Rachada (Paracuru-CE), pelo ensaio do MTT, 72h. Os dados correspondem a média  $\pm$  erro-padrão da média de 2 experimentos em duplicata.

Os extratos considerados ativos foram submetidos a uma análise quantitativa, para a obtenção das respectivas  $CI_{50}$  frente a células HCT-116 expostas por 72h a concentrações seriadas entre 0,003 e 50  $\mu\text{g/mL}$ , como apresentado na tabela 3. Os valores de  $CI_{50}$  para os 16 extratos testados variaram de 0,066 a 42,13  $\mu\text{g/mL}$ , sendo que o extrato obtido da cepa BRA-148 apresentou-se como o mais citotóxico, com  $CI_{50}$  de 0,066  $\mu\text{g/mL}$ , seguido pelos extratos das BRA-228 e BRA-090, com  $CI_{50}$  de 0,14 e 0,19  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

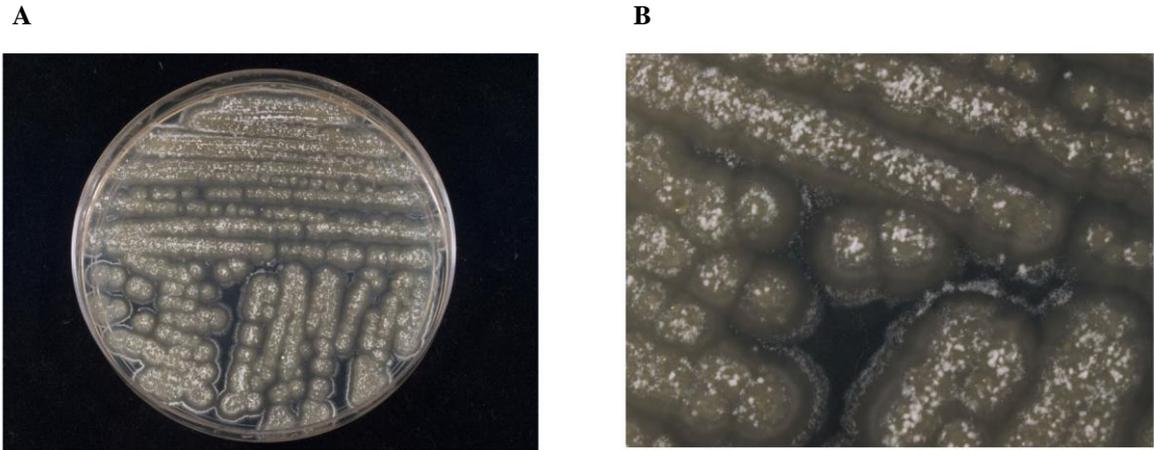
**Tabela 3.** Valores de  $CI_{50}$  e IC 95% ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos extratos brutos dos actinomicetos recuperados do sedimento da Praia da Pedra Rachada (Paracuru-CE), obtidos a partir da média e respectivos E.P.M. de 2 experimentos independentes em duplicata determinados por regressão não-linear gerado no programa GraphPad Prism 5.0. (N.D.: Não determinado).

Amostra	$CI_{50}$ (IC 95%)	$R^2$	Amostra	$CI_{50}$ (IC 95%)	$R^2$
<b>BRA-090</b>	0,19 (0,08 – 0,45)	0,8809	<b>BRA-228</b>	0,14 (0,06 – 0,33)	0,9179
<b>BRA-092</b>	24,81 (15,61 – 39,43)	0,8081	<b>BRA-230</b>	0,33 (0,06 – 1,74)	0,5989
<b>BRA-094</b>	33,76 (1,99 – 63,36)	0,9486	<b>BRA-231</b>	2,94 (1,69 – 5,14)	0,8621
<b>BRA-147</b>	11,71 (10,23 – 13,42)	0,9873	<b>BRA-232</b>	26,53 (9,38 – 75,06)	0,5641
<b>BRA-148</b>	0,066 (0,025 – 0,176)	0,8112	<b>BRA-233</b>	23,70 (11,96 – 46,97)	0,5520
<b>BRA-149</b>	14,99 (12,92 – 17,38)	0,9880	<b>BRA-235</b>	1,20 (0,35 – 4,18)	0,8638
<b>BRA-152</b>	> 50	N. D.	<b>BRA-280</b>	> 50	N. D.
<b>BRA-222</b>	> 50	N. D.	<b>BRA-286</b>	33,12 (22,54 – 48,68)	0,8472

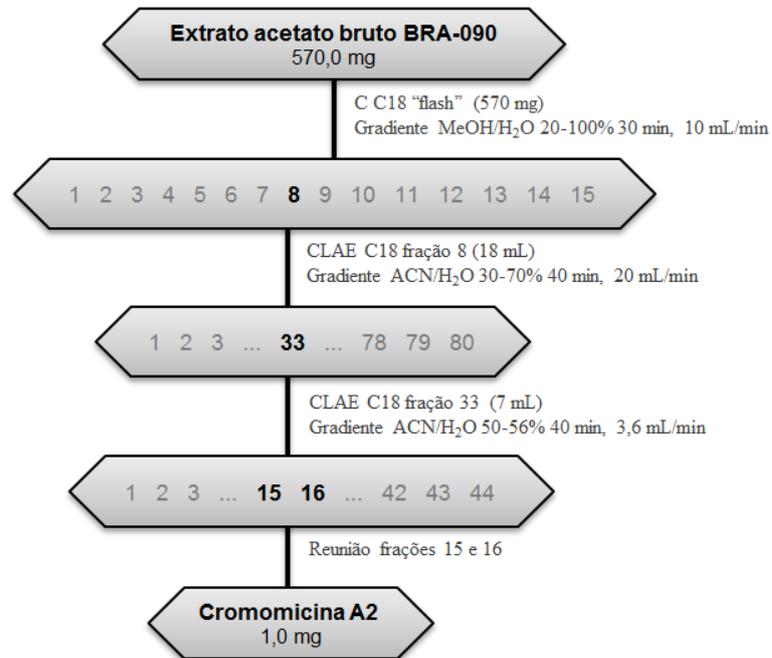
#### 4.2 Desrepliação e Fracionamento Químico do Extrato da BRA-090

O fracionamento do extrato bruto obtido de BRA-090 (figura 14) foi realizado utilizando técnicas cromatográficas para obtenção das frações, seguida pela espectrometria de massa para obtenção das massas moleculares dos compostos e posterior comparação destas massas em bancos de dados de produtos naturais, resultando no isolamento de um composto com atividade citotóxica, a cromomicina A2 (C-A2). Na figura 15 estão esquematizadas as etapas deste processo.

A identificação molecular da bactéria com base no sequenciamento do gene do RNAr 16s encontra-se em andamento.



**Figura 14.** Fotografias das colônias da BRA-090 (por Tito Lotufo). **A**, visão geral da placa; **B**, detalhe das colônias.



**Figura 15.** Fluxograma esquemático do fracionamento do extrato bruto da BRA-090.

### 4.3 Avaliação da Atividade Citotóxica *in vitro*

Os valores de  $CI_{50}$  da C-A2 isolada da cepa BRA-090 foram determinados para diversas linhagens celulares através ensaio do MTT após 24, 48 e 72h de exposição e estão apresentados na tabela 4. A C-A2 apresentou-se bastante citotóxica para as linhagens tumorais com 72h de incubação, com  $CI_{50}$  variando de 7,8 a 49,13 nM, sendo mais ativa para as linhagens de carcinoma de cólon (HCT-116), carcinoma de ovário (OVCAR-8) e leucemia promielocítica (HL-60). Com 48h de incubação a citotoxicidade da C-A2 apresentou-se mais pronunciada para as células de melanoma metastático (MALME-3M), com  $CI_{50}$  de 16,7 nM, por outro lado, para o tempo de 24h a C-A2 foi menos ativa e, para todas as linhagens tumorais, não se encontrou valores de  $CI_{50}$  abaixo de 50 nM. Quanto às células não tumorais fibroblásticas de pulmão fetal (MRC-5), a C-A2 mostrou-se com a menor atividade após 72h de incubação, com  $CI_{50}$  de 109nM.

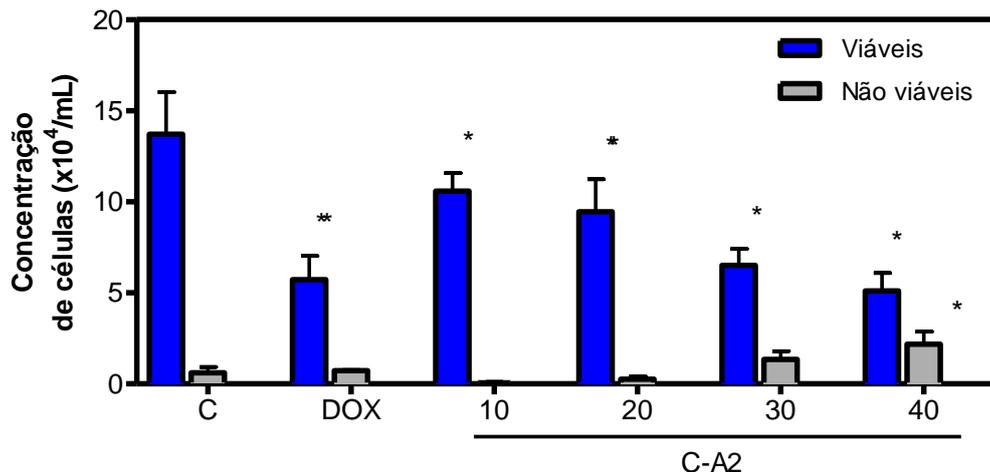
**Tabela 4.** Valores de  $CI_{50}$  (nM) da C-A2, em várias células tumorais e uma não tumoral, avaliados pelo ensaio do MTT em 24, 48 e 72h.  $CI_{50}$  e IC 95% obtidos a partir da média e respectivos E.P.M. de 2 experimentos em duplicata determinadas por regressão não-linear no programa GraphPad Prism 5.0. N.T., não testado.

Linhagens celulares	$CI_{50}$ C-A2 (nM)		
	24h	48h	72h
HCT-116	> 412,88	49,5 (40,7 – 60,3)	7,8 (6,09 – 9,86)
HL-60	> 50	22,3 (19,7 – 25,3)	9,97 (4,56 – 8,76)
MALME-3M	> 412,88	16,7 (7,23 – 38,56)	18,74 (14,42 – 24,36)
OVCAR-8	> 50	33,8 (28,2 – 40,5)	8,68 (7,65 – 9,86)
PC-3M	> 412,88	209,83 (122,46 – 359,5)	49,13 (27,57 – 87,52)
SF-295	> 50	> 50	13,74 (7,43 – 25,37)
MRC-5	N.T.	N.T.	109 (82,01 – 144,8)

## 4.5 Efeitos Sobre Células MALME-3M

### 4.5.1 Viabilidade e morfologia celular por microscopia ótica

O ensaio de exclusão pelo azul de Trypan permitiu a avaliação do efeito da C-A2 na viabilidade e no número de células MALME-3M, após 48h de exposição às concentrações de 10, 20, 30 e 40 nM. Estes resultados estão apresentados na figura 16. Nas condições experimentais deste estudo, C-A2 mostrou redução significativa do número de células viáveis em todas as concentrações e de modo concentração-dependente. Essa redução também foi observada para a doxorrubicina (100 nM). A partir da concentração de 30 nM de C-A2 observa-se o aumento do número de células não viáveis, mas apenas na concentração de 40 nM este aumento foi estatisticamente significativo.

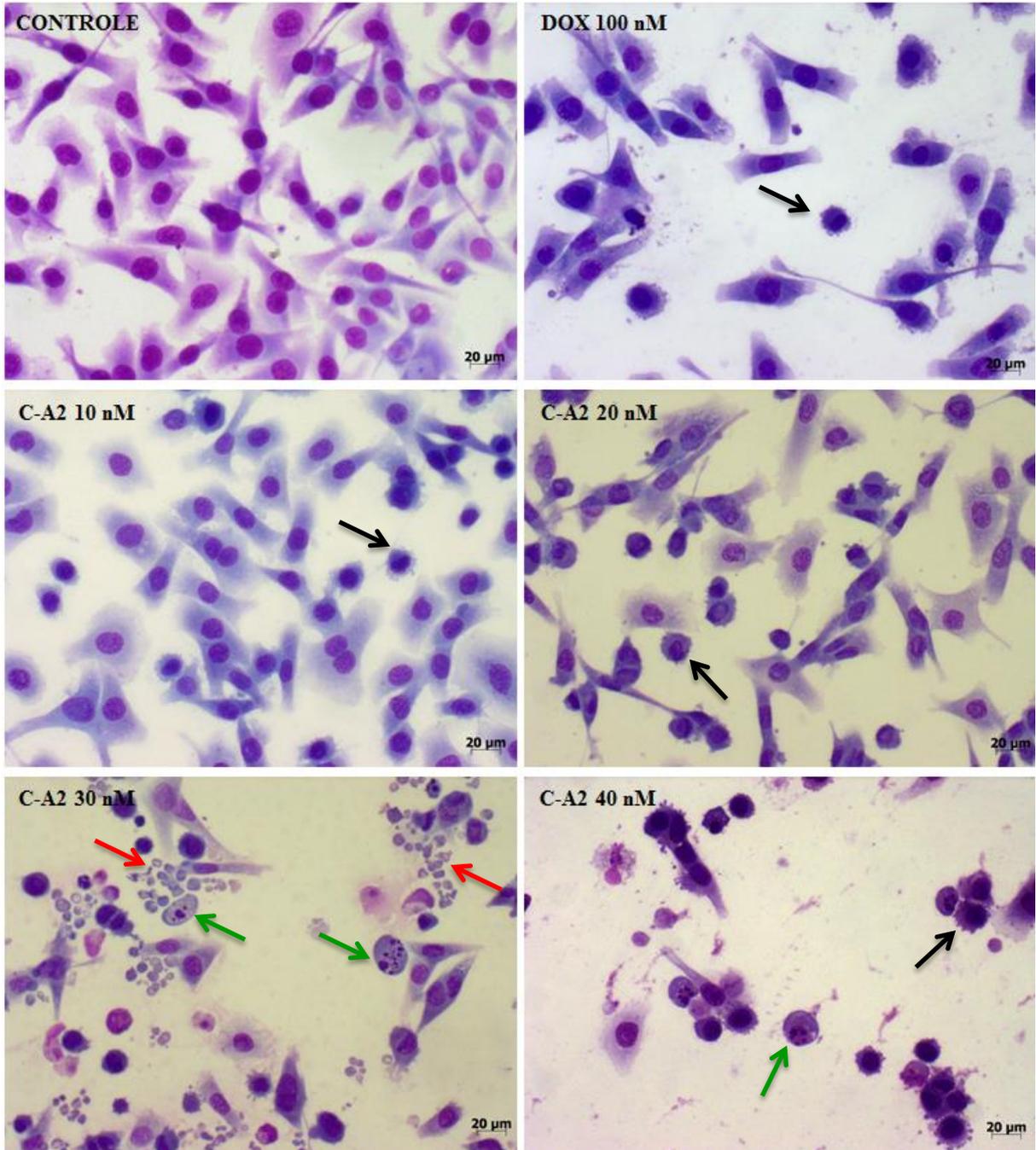


**Figura 16.** Efeito da C-A2 na viabilidade e proliferação de células MALME-3M por meio de exclusão pelo azul de Trypan após 48h de exposição. O controle negativo (C) recebeu apenas o veículo de diluição da substância (DMSO 0,4%). A doxorrubicina (DOX) 100 nM foi utilizada como controle positivo. As barras em azul correspondem ao número de células viáveis e as barras em cinza correspondem ao número de células não viáveis. Os dados correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de 3 experimentos independentes, realizados em duplicata. \* $p < 0,05$  comparado ao controle por ANOVA seguido por teste de Dunnet.

As alterações morfológicas induzidas pelo tratamento com C-A2 em células MALME-3M foram visualizadas por meio da coloração diferencial tipo Romanowsky. As células do controle negativo (C) apresentaram-se, em sua maioria, com formato alongado ou triangular devido aos prolongamentos citoplasmáticos e núcleo bem definido, geralmente interfásico, que são características comuns para esta linhagem, como representado na figura 17. As células tratadas com doxorrubicina (DOX 100 nM) mostraram-se em menor número,

em geral, com deformações dos prolongamentos citoplasmáticos e surgimento de *blebs* (do inglês, bolhas) na membrana plasmática.

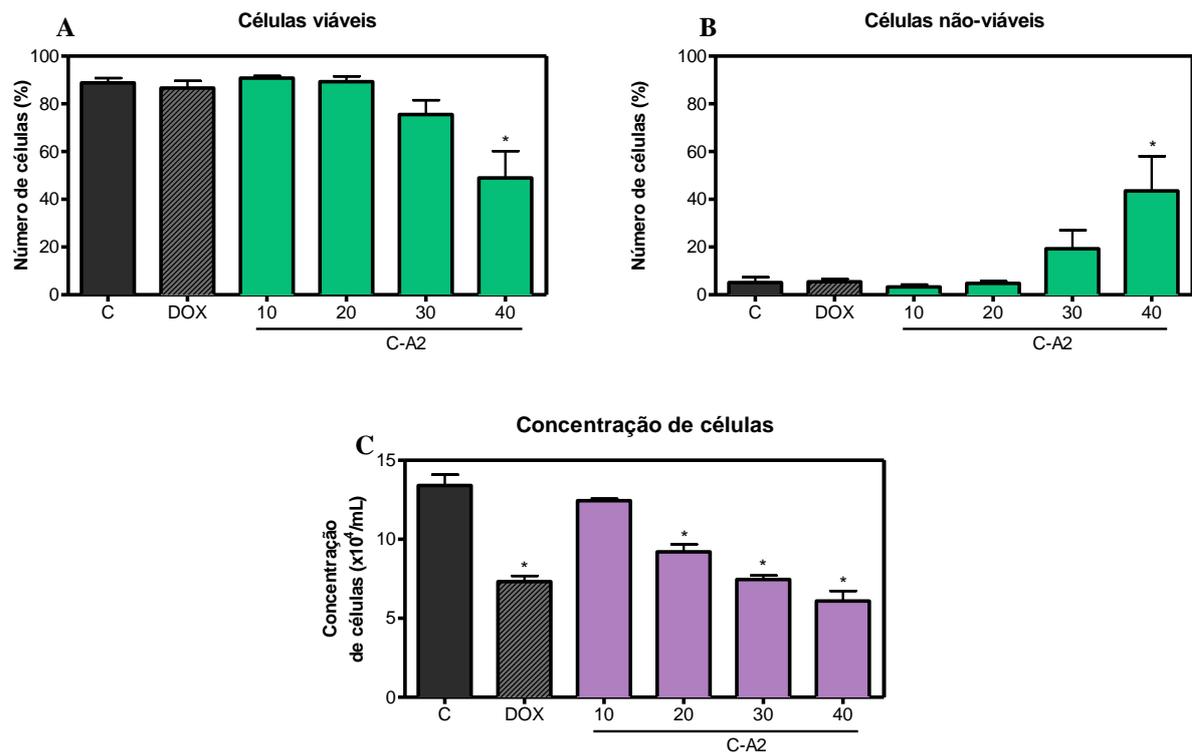
O tratamento com 10 nM de C-A2 induziu a formação de *blebs* na membrana plasmática acompanhada da perda do formato alongado da célula, no entanto, a maior parte das células ainda conservaram as características normais da linhagem. Com 20 nM de C-A2, há relativo aumento da ocorrência de células com *blebs* e com deformações na sua morfologia. Já nas concentrações de 30 e 40 nM, além da significativa redução do número de células, a maioria destas apresentavam redução do seu tamanho e perda do conteúdo citoplasmático, em especial na maior concentração testada. Os *blebs* de membrana são mais expressivos e a condensação e fragmentação nuclear são bastante evidentes. Essas alterações observadas no controle positivo e nos tratamentos com C-A2 por 48h são sugestivas de apoptose celular. Porém, nas células tratadas com 30 nM também foram observados muitos fragmentos celulares similares a autofagossomos, sendo sugestivos, portanto, do processo de autofagia.



**Figura 17.** Microfotografias de células MALME-3M controle negativo (DMSO 0,4%), positivo (doxorrubicina 100nM) e tratadas com C-A2 10, 20, 30 e 40 nM, após 48 de incubação e coradas com kit de coloração segundo Romanowsky. Ilustrações representativas de cada tratamento analisadas em microscópio óptico, sob aumento de 200X. As setas pretas indicam a formação dos *blebs* de membrana; as setas verdes, a fragmentação de DNA, e as setas vermelhas, os fragmentos celulares similares a autofagossomos.

#### 4.5.2 Viabilidade e número de células por citometria de fluxo

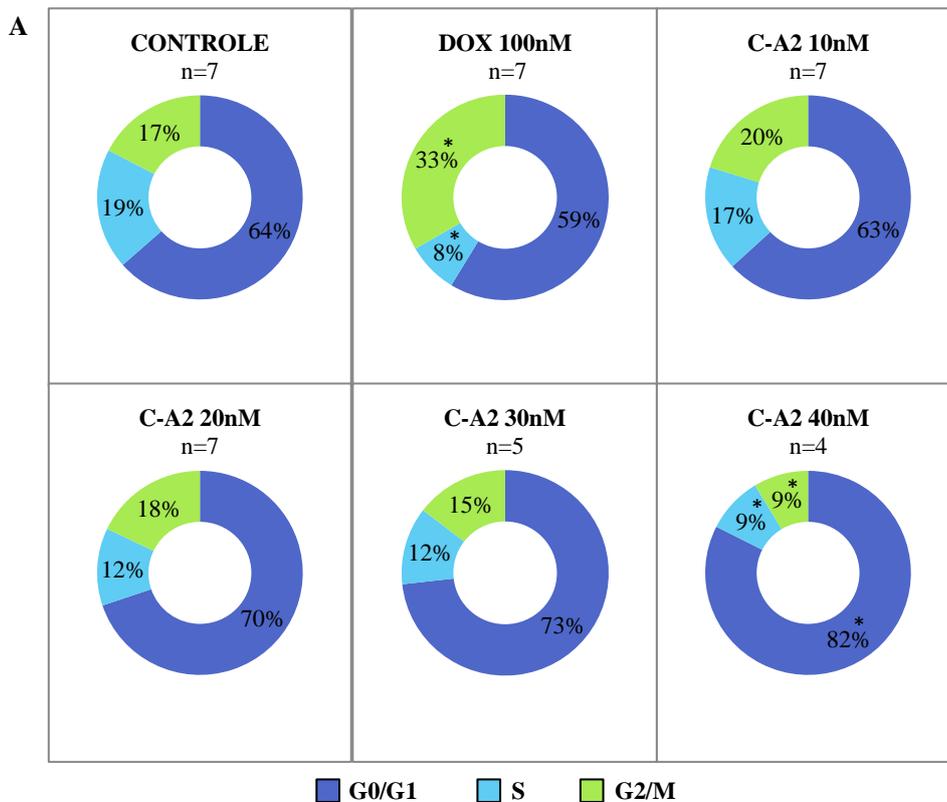
A avaliação do número e da viabilidade das células MALME-3M tratadas com C-A2 foi determinada através de citometria de fluxo. Os tratamentos com 10 e 20 nM de C-A2 não alteraram a integridade de membrana das células, tendo o número de células viáveis e não viáveis permanecido semelhante ao controle negativo, como observado na figura 18 A e B. A partir da concentração de 30 nM, a C-A2 reduziu o número de células com membrana íntegra, aumentando também o número de células não viáveis, ambos os efeitos significativos apenas no tratamento com 40 nM. A doxorrubicina (100 nM) não alterou a integridade de membrana das células tratadas, porém reduziu pela metade a concentração de células em relação ao número total de células viáveis. Adicionalmente, a C-A2 afetou a concentração de células de modo concentração-dependente a partir de 20 nM, quando houve redução significativa na contagem total de células, como representado na figura 18 C.

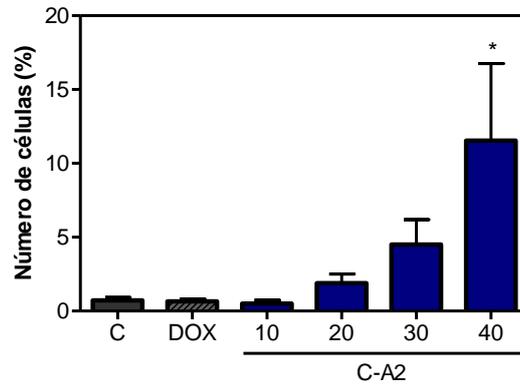


**Figura 18.** Viabilidade (**A e B**) designada pela integridade de membrana plasmática e número de células (**C**) MALME-3M, por citometria de fluxo, após 48h de exposição a 10, 20, 30 e 40 nM de C-A2. O controle negativo (C) recebeu apenas o veículo de diluição da substância (DMSO 0,4%). A doxorrubicina (DOX) 100 nM foi utilizada como controle positivo. Os dados apresentados correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de 3 experimentos independentes, realizados em duplicata, com 5000 eventos adquiridos por replicata. \* $p < 0,05$  comparado ao controle por ANOVA seguido por teste de Dunnet.

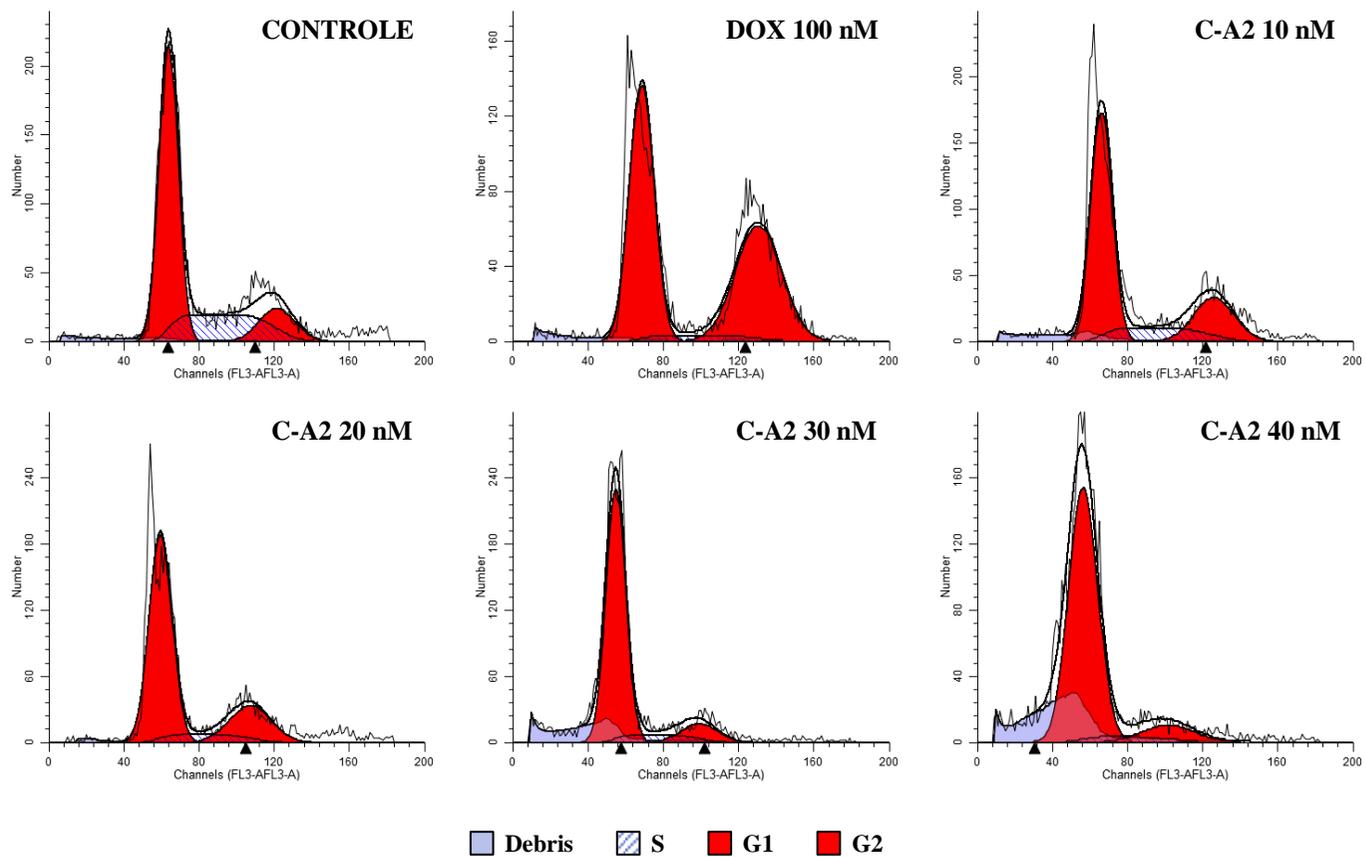
#### 4.5.3 Ciclo celular e fragmentação internucleossomal

As alterações na distribuição das células MALME-3M tratadas com C-A2, em cada fase do ciclo celular, puderam ser verificadas por meio da correlação direta entre a fluorescência emitida pelas células e o respectivo conteúdo de DNA nuclear. A C-A2 aumentou de forma concentração-dependente a quantidade de células na fase G0/G1, tendência esta iniciada na concentração de 10 nM, de modo que apenas em 40 nM o aumento foi significativo (figura 19). Em todas as concentrações testadas é possível notar que a C-A2 reduziu a fase S, porém apenas a 40 nM esse efeito apresentou significância estatística. A C-A2 também causou redução significativa da fase G2/M nesta concentração. A doxorrubicina, por sua vez, também induziu diminuição da fase S e aumento da fase G2/M, ambos significativos. Quanto a fragmentação de DNA, o tratamento com 40 nM foi o único que mostrou aumento estatisticamente significativo da porcentagem de células com DNA fragmentado. A representação destes efeitos também está ilustrada em histogramas na figura 20.



**B Fragmentação internucleossômica**

**Figura 19.** Efeito da C-A2 na distribuição das fases do ciclo celular (A) e na fragmentação internucleossômica (B) em células MALME-3M tratadas com 10, 20, 30 e 40 nM, avaliado por citometria de fluxo após 48h de incubação. O controle recebeu apenas o veículo de diluição da substância (DMSO 0,4%). A doxorrubicina (DOX) 100 nM foi utilizada como controle positivo. Os dados apresentados correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de n experimentos independentes, realizados em duplicata, com 5000 eventos adquiridos por replicata. \* $p < 0,05$  comparado ao controle por ANOVA seguido por teste de Dunnett.



**Figura 20.** Efeito concentração-dependente de C-A2 (10, 20, 30 e 40 mM) sobre as fases do ciclo celular em MALME-3M. O controle recebeu apenas o veículo de diluição da substância (DMSO 0,4%). A doxorubicina (DOX) 100 nM foi utilizada como controle positivo. Os histogramas foram obtidos pelo programa Accuri™ C6 Software 1.0.264.21e e modelados pelo programa ModFit LT. Ilustração de uma replicata representativa de cada tratamento.

## 5 DISCUSSÃO

Os actinomicetos marinhos já se tornaram uma relevante fonte de metabólitos secundários com importância biomédica, como antibacterianos, antitumorais, anti-inflamatórios e antifúngicos. Nos últimos anos, a busca por actinomicetos dos sedimentos marinhos, em vista deste potencial farmacológico, vem ganhando foco em diversas pesquisas ao redor do mundo (FENICAL e JENSEN, 2006; OLANO, MÉNDEZ e SALAS, 2009; SUBRAMANI e AALBERSBERG, 2012). Incluído nesta perspectiva, o presente estudo se desenvolveu a partir da triagem para atividade antitumoral de extratos de actinomicetos isolados do sedimento coletado na praia da Pedra Rachada, localizada no município de Paracuru, litoral do Ceará.

As 26 cepas cultiváveis aqui isoladas apresentaram características morfológicas de actinomicetos. Três tipos de meio de cultura diferentes preparados em água do mar natural foram utilizados nesta etapa inicial. A maioria dos actinomicetos foram recuperados de placas com meio SCA (amido-caseína), considerado um meio rico em nutrientes, assim como no trabalho de Das e colaboradores (2008), com actinomicetos do sedimento Golfo da Bengala, na Índia (DAS, LYLA e AJMAL KHAN, 2008), indicando, assim como em outros estudos, que amido como fonte de carbono e caseína como fonte de nitrogênio bem favorecem o desenvolvimento de actinomicetos (MALDONADO, STACH, et al., 2005).

Os meios TMA (minerais traços) e SWA (água do mar) contribuíram de forma quase que semelhante quanto ao número de actinomicetos recuperados. Ambos possuem concentrações relativamente baixas de nutrientes, que, em geral, favorecem o isolamento de actinomicetos, também por reduzirem naturalmente o crescimento de outros tipos de bactérias menos resistentes ao estresse nutricional (HAMEŞ-KOCABAŞ e UZEL, 2012; JENSEN et al., 2005) e que fugiam ao interesse deste trabalho.

O isolamento de actinomicetos é tradicionalmente realizado através da aplicação de pressões seletivas adequadas durante o processo de pré-tratamento das amostras, sejam estas sedimentos, invertebrados ou água do mar. O objetivo desta etapa é reduzir a incidência de bactérias de crescimento rápido e preservar a viabilidade das placas com culturas puras de actinomicetos (GOODFELLOW e WILLIAMS, 1983; SUBRAMANI e AALBERSBERG, 2013). Adicionalmente, a suplementação com antifúngicos, como a ciclo-heximida, é um passo importante para permitir que os actinomicetos tenham tempo e espaço necessários para

o seu crescimento (GONTANG, FENICAL e JENSEN, 2007; RAMESH, RAJESH e MATHIVANAN, 2009).

O crescimento de actinomicetos, que, em sua maioria, são formadores de esporos aéreos bastante resistentes, por exemplo, ao calor e a dessecação, pode ser significativamente favorecido pela aplicação de técnicas de pré-tratamento como a exposição ao calor seco, tratamento com 1,5% de fenol, centrifugação em gradientes de sacarose, irradiação com micro-ondas, filtração através de filtros de membrana de celulose, dentre outras. (SUBRAMANI e AALBERSBERG, 2013; XIONG et al., 2013).

As amostras de sedimento marinho coletadas neste estudo foram submetidas a dois tipos de processamento. Das 26 cepas, 18 foram isoladas a partir de placas processadas por M1, no qual o sedimento, após 48h secando em fluxo laminar, foi carimbado com rolha de esponja estéril, que, em seguida, foi utilizada para carimbar sequencialmente as placas de Petri com os três meios de isolamento. Já M2, no qual o sedimento foi suspenso em água do mar estéril e aquecido a 55°C em banho seco, rendeu o isolamento de 8 cepas. Diversos estudos tem aplicado estes tipos de metodologias para isolamento de actinomicetos (HAMEŞ-KOCABAŞ e UZEL, 2012; ÖZCAN et al., 2013). No estudo de Jensen e colaboradores (2005), por exemplo, métodos denominados “secagem/carimbo” e “diluição/aquecimento” renderam mais de 40%, cada, das placas com colônias de actinomicetos. Quando aplicados em combinação (um seguido do outro para uma mesma placa), a proporção de actinomicetos isolados subiu para 70% (JENSEN et al., 2005).

Este tipo de abordagem, no entanto, é limitada aos microrganismos que podem ser cultivados. Se as estimativas de culturabilidade dos microrganismos do sedimento marinho são de apenas 0,25%, sendo ainda mais baixa para a água do mar, 0,001 – 0,10% (AMANN, LUDWIG e SCHLEIFER, 1995), a exploração mais consistente dos actinomicetos, seja no âmbito ecológico, químico ou biotecnológico, requer inicialmente o emprego de metodologias de isolamento independentes de cultivo. A abordagem metagenômica tem permitido, a partir do acesso ao DNA microbiano total de determinada amostra, a investigação de produtos naturais codificados nos genomas de microrganismos previamente não cultiváveis. Uma vez identificados, os agrupamentos de genes referentes ao metabólito secundário de interesse podem ser sintetizados e introduzidos em outro hospedeiro microbiano adequado para sua expressão (GERWICK e FENNER, 2013; XIONG et al., 2013).

O sedimento marinho tem sido documentado como uma excelente fonte de actinomicetos, seja em abordagem mais tradicional, a partir de cepas cultiváveis em laboratório (BECERRIL-ESPINOSA et al., 2013; DAS, LYLA e AJMAL KHAN, 2008;

GONTANG, FENICAL e JENSEN, 2007; JENSEN et al., 2005; ÖZCAN et al., 2013; VICENTE et al., 2013), ou em busca da diversidade de actinomicetos para além dessa capacidade de cultivo (PRIETO-DAVÓ et al., 2013), ou ainda incorporando os dois tipos de abordagens (BECERRIL-ESPINOSA et al., 2013; MINCER, FENICAL e JENSEN, 2005).

O trabalho aqui apresentado insere-se neste contexto tradicional dependente de cultivo, todavia o cenário e o propósito nele desenvolvidos são inéditos. Ademais, este estudo pode ser ampliado a partir da realização de mais coletas de sedimento, da utilização de outros meios de cultura e outros métodos de isolamento mais seletivos para actinomicetos, além da inclusão da abordagem metagenômica.

Dos 26 extratos preparados em acetato de etila a partir da extração dos caldos de culturas das cepas isoladas, 16 foram considerados ativos por apresentarem de inibição em acima de 75% do crescimento de células de carcinoma de cólon (HCT-116) em cultura. Destes, o extrato da cepa denominada BRA-090 está entre os quatro (juntamente com BRA-148, -231 e -233) que inibiram mais que 95% do crescimento das células, e se destacou dentre estes, pelo maior percentual de inibição (98,38%). O valor de  $CI_{50}$  encontrado para este extrato (0,19  $\mu\text{g/mL}$ ) revelou seu potente efeito citotóxico, e complementou a escolha da cepa BRA-090 para os estudos subsequentes.

O cultivo em larga escala da BRA-090 foi, então, realizado durante sete dias utilizando 14 L de meio A1T e rendeu 570 mg de extrato bruto. A desreplcação do extrato levou a identificação de três moléculas conhecidas do grupo das cromomicinas – cromomicina A2 (C-A2), cromomicina A3 (C-A3) e desmetil-cromomicina A2 – e duas prováveis novas moléculas da mesma classe. Apenas a C-A2 (1 mg) pode ser isolada para seguir nos experimentos de investigação do seu efeito citotóxico em linhagens tumorais, nos quais mostrou potente atividade citotóxica, com  $CI_{50}$  na ordem de nM.

A C-A2 (também conhecida por aburamicina A) é um policetídeo aromático glicosilado pertencente à classe de compostos comumente referida como família dos ácidos aureólicos. Estes compostos são antibióticos antitumorais ativos contra bactérias Gram-positivas e diversas linhagens de células tumorais, cuja produção tem sido relatada para vários actinomicetos terrestres do gênero *Streptomyces* (MENÉNDEZ et al., 2006; WU et al., 2008; XIONG et al., 2012). No entanto, em estudo recente, Lu e colaboradores (2012) investigaram a atividade antitumoral do extrato de *Streptomyces* sp. recuperado do sedimento marinho de Bijiatuan, no litoral oeste da China, e chegaram a um novo ácido aureólico, cromomicina B, além das C-A2 e C-A3 (LU et al., 2012).

A C-A3 (toiomicina, aburamicina B) e a mitramicina (plicamicina, LA-7017, PA-144) são os membros mais conhecidos desta família, que também é representada pela olivomicina A, cromociclomicina e UCH-9 (LOMBÓ et al., 2006; LU et al., 2012; OGAWA et al., 1998) Estruturalmente, os compostos do tipo ácido aureólico, contém um cromóforo tricíclico (a exceção da cromocilomicina, com um cromóforo tetracíclico), que é glicosilado em duas posições diferentes com oligossacarídeos de vários comprimentos (ROHR, MÉNDEZ e SALAS, 1999).

A mitramicina foi o primeiro membro a ser descrito no início dos anos 50 e estudos relatam sua produção por *Streptomyces argillaceus*, *S. plicatus*, *S. tanashiensis* e *S. atroolivaceus* (LOMBÓ et al., 2006; SASTRY e PATEL, 1993). Sua aplicação clínica se dá no tratamento de determinados tipos de câncer, como carcinoma embrionário disseminado, carcinoma testicular e na doença de Paget, uma osteíte deformante (KENNEDY et al., 1968; ROHR, MÉNDEZ e SALAS, 1999). A C-A3 foi isolada em 1960 a partir de *Streptomyces griseus* (TATSUOKA, MIYAKE e MIZUNO, 1960 apud MIYAMOTO et al., 1966) e, além de inibir fortemente o crescimento de diversas células tumorais, compartilha algumas atividades biológicas com a mitramicina. Ambos se apresentaram como potentes inibidores de apoptose neuronal, abrindo possibilidades para sua aplicação no tratamento de doenças neurológicas (CHATTERJEE et al., 2001). A capacidade de indução da diferenciação eritroidal em células K562 também foi encontrada para estas moléculas, incluindo-as como candidatas no tratamento de certas doenças hematológicas (BIANCHI et al., 1999). Entretanto, o uso clínico destes compostos foi limitado pela manifestação de toxicidade hepática, renal e gastrointestinal (HU, Y. et al., 2011).

Embora, inicialmente isolados em virtude da sua atividade antibiótica contra bactérias Gram-positivas, não sendo ativos contra Gram-negativas devido a problemas de permeabilidade de membrana, o principal interesse farmacológico nos ácidos aureólicos reside na sua atividade antitumoral (LOMBÓ et al., 2006). No estudo de González-Sabin e colaboradores (2012), com o objetivo de desenvolver novos ácidos aureólicos, os autores realizaram reações de acetilação catalisada por lipase a partir da C-A3 para gerar cinco análogos, que foram então testados para atividade antitumoral e comparados com a C-A3. Apenas um dos análogos mostrou-se mais citotóxico que a C-A3, que por sua vez, apresentou valores de  $CI_{50}$  entre 0,04 a 0,13  $\mu\text{M}$  para as quatro linhagens tumorais testadas, e 1,0  $\mu\text{M}$  para a linhagem de fibroblastos murinos normais (GONZÁLEZ-SABÍN et al., 2012).

Outro trabalho que aborda a triagem de análogos de cromomicinas para atividade anticâncer foi realizado por Hu e colaboradores (2011), partindo do extrato de *Streptomyces*

sp. isolado do sedimento de um lago hipersalino localizado em pequenas ilhas ao sul de Bahamas. C-A2, C-A3 e mais sete análogos foram isolados e testados em duas linhagens de carcinoma pulmonar, A549 e HCC44. Ambas as cromomicinas foram as mais ativas, sendo os valores  $CI_{50}$  da C-A2 (0,26 e 0,44 nM) várias vezes menor do que os da C-A3 (1 e 42 nM) (HU, et al., 2011).

Cromomicinas também foram isoladas do extrato *Streptomyces* sp., desta vez, recuperadas do sedimento do litoral chinês. Dentre estas, as conhecidas C-A2 e A3, e uma nova integrante da classe, cromomicina-B, foram testadas para atividade citotóxica em cinco linhagens tumorais e uma não tumoral. Todas as três substâncias apresentaram forte atividade citotóxica, sendo a C-A2 a mais ativa, em especial para a linhagem HepG2 (carcinoma hepatocelular de fígado humano) com  $CI_{50}$  de 0,5 nM. Para a linhagem HCT-116, os valores de  $CI_{50}$  encontrados para C-A2 e C-A3 foram de 5 e 20 nM, respectivamente (LU et al., 2012).

Os valores de  $CI_{50}$  da C-A2 isolada no presente trabalho também reforçam a potente citotoxicidade desta substância contra células tumorais em cultura. A C-A2 foi testada em sete linhagens de células tumorais através do ensaio do MTT e sua potência variou entre os três tempos de incubação. Com 72h, a menor  $CI_{50}$  foi obtida para a linhagem HCT-116 (7,8 nM). Nas linhagens OVCAR-8 e HL-60 a atividade citotóxica também foi bastante pronunciada, com  $CI_{50}$  igual a 8,68 e 9,97 nM, respectivamente, para este mesmo tempo de incubação. Com 48h, o efeito da C-A2 foi maior em células MALME-3M com  $CI_{50}$  de 16,7 nM. Especificamente para esta linhagem, o valor de  $CI_{50}$  de 72h manteve-se aproximado (18,74 nM) ao obtido para 48h. Já para no tempo de 24h, as  $CI_{50}$  da C-A2 para todas as linhagens mostraram-se acima de 50 nM para HL-60, OVCAR8, SF-295 ou acima de 412,88 nM para HCT-116, MALME-3M e PC-3M. É interessante observar, que quando testada contra a linhagem não tumoral MRC-5, a  $CI_{50}$  da C-A2 foi de 109 nM, maior do que todas as outras  $CI_{50}$  encontradas para as células tumorais.

Diversos estudos tem demonstrado que a base da ação antitumoral das cromomicinas, e dos demais ácido aureólicos, parte da interação com as fendas menores do DNA, em regiões ricas em conteúdo guanina-citosina (G-C), de modo não intercalante, por meio de um complexo de dímeros com o íon  $Mg^{2+}$ . Esta interação causa inibição dos processos de replicação e transcrição do DNA determinando a potente atividade citotóxica destas moléculas contra células tumorais (CHAKRABARTI, BHATTACHARYYA e DASGUPTA, 2001).

Uma vez comprovada a citotoxicidade pelo ensaio do MTT, a linhagem de melanoma metastático MALME-3M foi a escolhida, com base no menor valor de  $CI_{50}$  apresentado no tempo de 48h, para investigação dos efeitos da C-A2 sobre a viabilidade e a morfologia celular, além dos efeitos sobre as fases do ciclo celular e a integridade do DNA nuclear. O melanoma é um tipo de câncer, que embora não sendo um dos mais comuns entre os demais cânceres dermatológicos, é responsável por cerca de 80% das mortes por câncer de pele. O diagnóstico precoce aumenta as chances de cura por intervenção cirúrgica, no entanto, o melanoma metastático é geralmente refratário às terapias existentes e é considerado de difícil prognóstico. O tempo médio de sobrevivência dos pacientes com este diagnóstico é de seis meses e taxa de sobrevivência em cinco anos inferior a 5%, revelando a importância da busca por novas estratégias de tratamento para este tipo de câncer (CUMMINS et al., 2006; GRAY-SCHOPFER, WELLBROCK e MARAIS, 2007).

A redução da viabilidade celular induzida pela C-A2 foi observada nos experimentos aqui realizados, sendo mais notável para as concentrações de 30 e 40 nM. Pelo teste de exclusão por azul de Trypan, o número de células viáveis diminuiu em todas as concentrações testadas (10, 20, 30 e 40 nM) de forma concentração-dependente. Na análise por citometria de fluxo, esta redução foi significativa apenas para a maior concentração de C-A2, que também exibiu aumento significativo do número de células não viáveis. Ambos os métodos, exclusão por azul de Trypan e incorporação de iodeto de propídeo analisada por citometria de fluxo, baseiam-se na avaliação da viabilidade celular a partir da integridade de membrana. O número de células não viáveis referente ao tratamento com C-A2 a 30 nM, ainda que não tenha apresentado significância estatística, apresenta uma tendência de aumento. Aumento este, que foi, no tratamento com 40 nM de C-A2, significativo para ambas as metodologias.

O efeito de C-A2 sobre o ciclo celular das células MALME-3M, no qual foi observada uma clara tendência de redução da fase S pode estar relacionado ao efeito, já bem descrito, mas para C-A3, sobre a replicação do DNA. É justamente durante a fase S que ocorre a síntese de DNA, resultando na duplicação do material genético da célula-mãe, que será distribuído igualmente entre as duas células-filhas durante a fase M, a mitose. Este é um processo necessariamente acurado e relativamente rápido, considerando totalidade do ciclo celular, já que é nesta fase em que a célula está mais sensível, pois o DNA encontra-se mais exposto, e por consequentemente mais susceptível ao ataque de substâncias genotóxicas (WILLIAMS e STOEBER, 2012).

Este efeito sobre a fase S induzido por C-A2 pode ser observado desde o tratamento de 10 até o de 40 nM, sendo apenas para este último estatisticamente significativo. Quanto a G0/G1, o perceptível, porém discreto, aumento da porcentagem de células nesta fase nas três primeiras concentrações testadas não permitiu uma distinção significativa em relação ao controle, o que ocorreu apenas para a concentração de 40 nM de C-A2. Para a fase G2/M, a C-A2 também mostrou uma tendência para a redução do número de células neste estágio do ciclo celular. O tratamento de 40 nM, foi portanto, o que melhor representou os efeitos da C-A2 aqui observados, ou seja, redução das células em fase S e acúmulo delas em fase G0/G1.

Esse intenso aumento da quantidade de células em fase G0/G1, acompanhado da diminuição das células nas demais fases do ciclo celular, como observado para o tratamento com C-A2 a 40 nM, pode ser sugestivo do acúmulo de células quiescentes, ou seja, que saíram do ciclo celular e cessaram a sua proliferação. As células quiescentes encontram-se na fase G0, onde as atividades metabólicas são drasticamente reduzidas, mantendo-se apenas as funções basais de sobrevivência (SCHWARTZ e SHAH, 2005). Alguns tipos celulares, como neurônios e musculatura cardíaca, entram em G0 quando terminam o seu processo de diferenciação e se tornam maduras. A partir daí, seguem quiescentes, sem duplicar, mas exercendo as suas funções durante toda a vida do organismo. Outras células podem entrar em G0 devido à falta de estímulos de fatores de crescimento ou de falta de nutrientes. E, ainda, há tipos de células que nunca entram em G0, pois estão constantemente em divisão, como é o caso de células epiteliais (ALBERTS et al., 2010).

As células em G0 possuem a mesma ploidia que as células em G1 e, portanto, esses dois grupos não podem ser diferenciados pela técnica de citometria de fluxo como aqui empregada. Entretanto, diferentemente de G0, durante G1 ocorre intensa atividade metabólica, e as funções biossintéticas estão em alta. É durante essa fase que a célula aumenta o seu estoque de proteínas e organelas, que serão distribuídas entre as células-filhas, e cresce bastante em tamanho. Este é o preparo necessário para que a célula proceda para a fase seguinte do ciclo celular, a fase S (WILLIAMS e STOEBER, 2012). Assim sendo, essa fase é por demais sensível a compostos que estejam interferindo nos processos de síntese de proteínas, seja durante a transcrição de DNA ou a tradução. Como foi demonstrado por Berh e colaboradores (1969), C-A3 atua também sobre a função de RNA polimerase, induzindo inibição da sua atividade e prejudicando a síntese de proteínas (BEHR, HONIKEL e HARTMANN, 1969). Baseado nisso, e considerando que as propriedades de ambas as cromomicinas sejam semelhantes, pode-se sugerir que a atividade metabólica das células MALME-3M expostas a concentrações mais altas da substância em estudo, C-A2, esteja

sendo diminuída, impedindo que o ciclo celular proceda e induzindo as células a entrarem em estado de quiescência. Entretanto, para se confirmar que as células expostas a C-A2 estariam em G0 e não em G1, seriam necessários mais estudos avaliando marcadores bioquímicos de proliferação celular.

Quanto a morfologia das células sob o efeito da C-A2 a 10 nM, foi possível notar que, apesar de a maioria das células terem preservado a sua morfologia característica, algumas exibiram características estruturais do processo apoptótico, como a redução do volume celular e do conteúdo citoplasmático e a formação de *blebs* de na membrana plasmática. Quando elevada a concentração para 30 ou 40 nM de C-A2, estas alterações estruturais sugestivas de apoptose aparecem intensificadas, além da recorrente condensação e fragmentação nuclear. Adicionalmente, o aumento da fragmentação de DNA foi nítido para a concentração de 40nM, apesar da margem de erro apresentada.

A apoptose é um processo fisiológico acurado e de importância crucial para a manutenção da homeostase em organismos multicelulares, visto que o crescimento tumoral está intimamente ligado ao não cumprimento dos estímulos indutores de morte celular por este processo (HANAHAN e WEINBERG, 2011). Participam deste conjunto de eventos bioquímicos, uma família de proteases, as caspases, que precisamente encaminham a célula para a morte, comumente referida como morte celular programada. Morfologicamente, as células apoptóticas apresentam redução do volume celular, condensação e fragmentação internucleossomal do DNA, além de alterações na membrana, os chamados *blebs* (FOSTER, 2008). A visualização destas alterações estruturais, entretanto, precisa ser complementada com a comprovação dos eventos bioquímicos, como a clivagem das caspases, para que se determine o processo referido como apoptose (KRYSKO et al., 2008).

Ainda para o tratamento com 30 nM de C-A2, a presença de grande quantidade de fragmentos celulares foi observada, que se considerados como autofagossomos, podem indicar a ocorrência do processo de autofagia. A autofagia é uma importante resposta celular-fisiológica, que assim como a apoptose, pode ser fortemente induzida em certos estados de estresse celular, como a baixa disponibilidade de nutrientes (MIZUSHIMA, 2007). O processo autofágico permite que as células degradem organelas inteiras ou grandes agregados proteicos, disponibilizando os catabólitos resultantes para reciclagem em outros processos de biossíntese e no metabolismo energético. Iniciando esse processo, ocorre a incorporação da organela e a extensão de uma membrana dupla que se fecha juntamente com uma porção do citoplasma, formando o autofagossomo. Este, por sua vez, funde-se a lisossomos portadores de diversas hidrolases ácidas, que, então, digerem o seu conteúdo. Deste modo, os metabólitos

de baixo peso molecular que são gerados permitem a sobrevivência destas células enquanto sob condições adversas (ALBERTS et al., 2010; HANAHAN e WEINBERG, 2011).

As células tumorais são sabidas por recorrerem à autofagia para sobreviver a períodos transitórios de escassez de nutrientes e a redução da síntese de proteínas pode ser assim interpretada. Esse processo pode ser reversível, mas quando a autofagia é sustentada por períodos longos, torna-se excessiva e leva à morte celular (WHITE e DIPAOLA, 2009). Considerando que a C-A2 esteja prejudicando a síntese proteica por inibir o funcionamento da RNA polimerase e conseqüentemente afetando a realização dos processos metabólicos celulares, a autofagia seria uma provável resposta iniciada pelas células como recurso para estender a sua sobrevivência, escapando inicialmente da morte, por exemplo, por apoptose, ao realizar a autodigestão. Entretanto, para a confirmação de que este processo esteja sendo induzido pela C-A2 aqui estudada, outras metodologias deverão ser aplicadas.

## 6 CONCLUSÃO

Os actinomicetos da costa do Ceará são uma importante fonte de substâncias com potencial anticâncer. A cepa BRA-090, dali recuperada, foi reconhecida como produtora de diversas moléculas do grupo das cromomicinas, de onde a cromomicina A2, a mais abundante entre elas, foi isolada. Esta substância mostrou-se bastante citotóxica contra diversas linhagens de células tumorais e, particularmente em células MALME-3M, induzindo alterações no ciclo celular, possivelmente, autofagia e morte celular, especialmente por apoptose.

## REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1392 p.
- ABREU, P. A. et al. Identification of Pyrroloformamide as a Cytokines Modulator. **Chembiochem: a European journal of chemical biology**, 2013, in press.
- AMANN, R. I.; LUDWIG, W. e SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological reviews**, v. 59, n. 1, p. 143–69, 1995.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **What is câncer?** Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/what-is-cancer>>. Acesso em: 15.mai.2014.
- ANDRÉO, M. A. et al. Systematic UPLC-ESI-MS/MS study on the occurrence of staurosporine and derivatives in associated marine microorganisms from *Eudistoma vannamei*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 2, p. 335–343, doi:10.1590/S0103-50532012000200021, 2012.
- ARTHAUD, I. D. B. et al. Studies on the secondary metabolites of a *Pseudoalteromonas* sp. isolated from sediments collected at the northeastern coast of Brazil. **Chemistry & biodiversity**, v. 9, n. 2, p. 418–27, doi:10.1002/cbdv.201100092, 2012.
- AUSUBEL, J. H.; CRIST, D. e WAGGONER, P. **EDS First Census of Marine Life 2010. Highlights of a Decade of Discovery**. [S.l: s.n.], 2010.
- BECERRIL-ESPINOSA, A. et al. Marine Actinobacteria from the Gulf of California: diversity, abundance and secondary metabolite biosynthetic potential. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 103, n. 4, p. 809–19, doi:10.1007/s10482-012-9863-3, 2013.
- BEHR, W.; HONIKEL, K. e HARTMANN, G. Interaction of the RNA Polymerase Inhibitor Chromomycin with DNA\*. **European Journal of Biochemistry**, v. 9, n. 1, p. 82–92, doi:10.1111/j.1432-1033.1969.tb00579.x, 1969.
- BÉRDY, J. Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. **The Journal of antibiotics**, v. 65, n. 8, p. 385–95, doi:10.1038/ja.2012.27, 2012.
- BERGMANN, W. e FEENEY, R. J. CONTRIBUTIONS TO THE STUDY OF MARINE PRODUCTS. XXXII. THE NUCLEOSIDES OF SPONGES. I. 1. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 16, n. 6, p. 981–987, doi:10.1021/jo01146a023, 1951.
- BHATNAGAR, I. e KIM, S.-K. Immense essence of excellence: marine microbial bioactive compounds. **Marine drugs**, v. 8, n. 10, p. 2673–701, doi:10.3390/md8102673, 2010.
- BIANCHI, N. et al. The DNA-binding drugs mithramycin and chromomycin are powerful inducers of erythroid differentiation of human K562 cells. **British journal of haematology**, v. 104, n. 2, p. 258–65, 1999.

- BLUNT, J.; BUCKINGHAM, J. e MUNRO, M. Taxonomy and Marine Natural Products Research. In: FATTORUSSO, E.; GERWICK, W. H.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O. (Eds.). **Handbook of Marine Natural Products**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012. p. 1–4.
- CHAKRABARTI, S.; BHATTACHARYYA, D. e DASGUPTA, D. Structural basis of DNA recognition by anticancer antibiotics, chromomycin A(3), and mithramycin: roles of minor groove width and ligand flexibility. **Biopolymers**, v. 56, n. 2, p. 85–95, doi:10.1002/1097-0282(2000)56:2<85::AID-BIP1054>3.0.CO;2-7, 2001.
- CHATTERJEE, S. et al. Sequence-selective DNA binding drugs mithramycin A and chromomycin A3 are potent inhibitors of neuronal apoptosis induced by oxidative stress and DNA damage in cortical neurons. **Annals of neurology**, v. 49, n. 3, p. 345–54, 2001.
- COSTA-LOTUFO, L. et al. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: histórico & perspectivas. **Quim Nova**, v. X, n. 00, p. 1–14, 2009.
- CUMMINS, D. L. et al. Cutaneous malignant melanoma. **Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic**, v. 81, n. 4, p. 500–7, doi:10.4065/81.4.500, 2006.
- DAS, S.; LYLA, P. S. e AJMAL KHAN, S. Distribution and generic composition of culturable marine actinomycetes from the sediments of Indian continental slope of Bay of Bengal. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 26, n. 2, p. 166–177, doi:10.1007/s00343-008-0166-5, 2008.
- FELING, R. H. et al. Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus salinospira. **Angewandte Chemie (International ed. in English)**, v. 42, n. 3, p. 355–7, doi:10.1002/anie.200390115, 2003.
- FENICAL, W. Marine pharmaceuticals: past, present, and future. **Oceanography**, v. 19, n. 2, p. 110–119, 2006.
- FENICAL, W. e JENSEN, P. R. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. **Nature chemical biology**, v. 2, n. 12, p. 666–73, doi:10.1038/nchembio841, 2006.
- FERREIRA, E. G. et al. Guanidine Alkaloids from *Monanchora arbuscula*: Chemistry and Antitumor Potential. **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, n. 8, p. 1433–1445, doi:10.1002/cbdv.201000161, 2011.
- FOSTER, I. Cancer: A cell cycle defect. **Radiography**, v. 14, n. 2, p. 144–149, doi:10.1016/j.radi.2006.12.001, 2008.
- GERWICK, W. H. e FENNER, A. M. Drug discovery from marine microbes. **Microbial ecology**, v. 65, n. 4, p. 800–6, doi:10.1007/s00248-012-0169-9, 2013.
- GERWICK, W. H. e MOORE, B. S. Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology. **Chemistry & biology**, v. 19, n. 1, p. 85–98, doi:10.1016/j.chembiol.2011.12.014, 2012.

- GIDDINGS, L.-A. e NEWMAN, D. J. Microbial natural products: molecular blueprints for antitumor drugs. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 40, n. 11, p. 1181–210, doi:10.1007/s10295-013-1331-1, 2013.
- GIVAN, A. L. Flow Cytometry. In: HAWLEY, T. S.; ROBERT G HAWLEY (Eds.). **Methods in Molecular Biology: Flow Cytometry Protocols**. 2<sup>a</sup>. ed. Totowa: Humana Press, 2004. v. 263p. 434.
- GONTANG, E. a.; FENICAL, W. e JENSEN, P. R. Phylogenetic diversity of gram-positive bacteria cultured from marine sediments. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 10, p. 3272–82, doi:10.1128/AEM.02811-06, 2007.
- GONZÁLEZ-SABÍN, J. et al. Lipase-catalyzed preparation of chromomycin A<sub>3</sub> analogues and biological evaluation for anticancer activity. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 22, n. 13, p. 4310–3, doi:10.1016/j.bmcl.2012.05.015, 2012.
- GOODFELLOW, M. e WILLIAMS, S. T. Ecology of actinomycetes. **Annual review of microbiology**, v. 37, n. 41, p. 189–216, doi:10.1146/annurev.mi.37.100183.001201, 1983.
- GRAY-SCHOPFER, V.;; WELLBROCK, C. e MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 851–7, doi:10.1038/nature05661, 2007.
- HAMEŞ-KOCABAŞ, E. E. e UZEL, A. Isolation strategies of marine-derived actinomycetes from sponge and sediment samples. **Journal of microbiological methods**, v. 88, n. 3, p. 342–7, doi:10.1016/j.mimet.2012.01.010, 2012.
- HANAHAN, D. e WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.
- HILL, R. T. e FENICAL, W. Pharmaceuticals from marine natural products: surge or ebb? **Current opinion in biotechnology**, v. 21, n. 6, p. 777–9, doi:10.1016/j.copbio.2010.10.007, 2010.
- HOROBIN, R. W. How Romanowsky stains work and why they remain valuable - including a proposed universal Romanowsky staining mechanism and a rational troubleshooting scheme. **Biotechnic & histochemistry : official publication of the Biological Stain Commission**, v. 86, n. 1, p. 36–51, doi:10.3109/10520295.2010.515491, 2011.
- HU, G.-P. et al. Statistical research on marine natural products based on data obtained between 1985 and 2008. **Marine drugs**, v. 9, n. 4, p. 514–25, doi:10.3390/md9040514, 2011.
- HU, Y. et al. Chromomycin SA analogs from a marine-derived Streptomyces sp. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 19, n. 17, p. 5183–9, doi:10.1016/j.bmc.2011.07.013, 2011.
- IMHOFF, J. F.;; LABES, A. e WIESE, J. Bio-mining the microbial treasures of the ocean: new natural products. **Biotechnology advances**, v. 29, n. 5, p. 468–82, doi:10.1016/j.biotechadv.2011.03.001, 2011.

- JENSEN, P. R. et al. Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. **Environmental microbiology**, v. 7, n. 7, p. 1039–48, doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00785.x, 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, n. 1, p. 93–101, doi:10.1016/S0022-0981(02)00499-9, 2003.
- JIMENEZ, P. C. et al. Cytotoxic and Antimicrobial Activities in Hydromethanolic Extracts of Sponges (Porifera) from the Northeastern Brazilian Coast. **Arquivo De Ciências Do Mar**, v. 37, p. 85–91, 2004.
- JIMENEZ, P. C. et al. Cytotoxic activity of a dichloromethane extract and fractions obtained from *Eudistoma vancouveri* (Tunicata: Ascidiacea). **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology**, v. 151, n. 3, p. 391–8, doi:10.1016/j.cbpa.2007.02.018, 2008.
- JIMENEZ, P. C. et al. Structure elucidation and anticancer activity of 7-oxostaurosporine derivatives from the Brazilian endemic tunicate *Eudistoma vancouveri*. **Marine drugs**, v. 10, n. 5, p. 1092–102, doi:10.3390/md10051092, 2012.
- JIMENEZ, P. C. et al. Cytotoxicity of actinomycetes associated with the ascidian *Eudistoma vancouveri* (Millar, 1977), endemic of northeastern coast of Brazil. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 41, n. 2, p. 335–343, doi:10.3856/vol41-issue2-fulltext-12, 2013.
- KENNEDY, B. J. et al. Effect of mithramycin on a mouse glioma. **Cancer research**, v. 28, n. 1, p. 91–7, 1968.
- KRYSKO, D. V et al. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 44, n. 3, p. 205–21, doi:10.1016/j.jymeth.2007.12.001, 2008.
- LAM, K. S. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. **Current opinion in microbiology**, v. 9, n. 3, p. 245–51, doi:10.1016/j.mib.2006.03.004, 2006.
- LOMBÓ, F. et al. The aureolic acid family of antitumor compounds: structure, mode of action, biosynthesis, and novel derivatives. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 73, n. 1, p. 1–14, doi:10.1007/s00253-006-0511-6, 2006.
- LU, J. et al. Aureolic acids from a marine-derived *Streptomyces* sp. WBF16. **Microbiological research**, v. 167, n. 10, p. 590–5, doi:10.1016/j.micres.2012.06.001, 2012.
- MALDONADO, L. a.; STACH, J. E. M.; et al. Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 87, n. 1, p. 11–8, doi:10.1007/s10482-004-6525-0, 2005.
- MALDONADO, L. a.; FENICAL, W.; et al. *Salinispora arenicola* gen. nov., sp. nov. and *Salinispora tropica* sp. nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family Micromonosporaceae. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 55, n. Pt 5, p. 1759–66, doi:10.1099/ijs.0.63625-0, 2005.

MAYER, A. M. S. et al. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. **Trends in pharmacological sciences**, v. 31, n. 6, p. 255–65, doi:10.1016/j.tips.2010.02.005, 2010.

MAYER, A. M. S. et al. Marine pharmacology in 2009-2011: marine compounds with antibacterial, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of . **Marine drugs**, v. 11, n. 7, p. 2510–73, doi:10.3390/md11072510, 2013.

MENÉNDEZ, N. et al. Deoxysugar transfer during chromomycin A3 biosynthesis in *Streptomyces griseus* subsp. *griseus*: new derivatives with antitumor activity. **Applied and environmental microbiology**, v. 72, n. 1, p. 167–77, doi:10.1128/AEM.72.1.167-177.2006, 2006.

MIAO, V. e DAVIES, J. Actinobacteria: the good, the bad, and the ugly. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 98, n. 2, p. 143–50, doi:10.1007/s10482-010-9440-6, 2010.

MINCER, T. J.;; FENICAL, W. e JENSEN, P. R. Culture-dependent and culture-independent diversity within the obligate marine actinomycete genus *Salinispora*. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 11, p. 7019–28, doi:10.1128/AEM.71.11.7019-7028.2005, 2005.

MIYAMOTO, M. et al. The full structures of three chromomycins, A2, A3 and A4. **Tetrahedron Letters**, v. 7, n. 6, p. 545–552, doi:http://dx.doi.org.ez11.periodicos.capes.gov.br/10.1016/S0040-4039(01)99663-7, 1966.

MIZUSHIMA, N. Autophagy: process and function. **Genes & development**, v. 21, n. 22, p. 2861–73, doi:10.1101/gad.1599207, 2007.

MOLINSKI, T. F. et al. Drug development from marine natural products. **Nature reviews. Drug discovery.**, v. 8, n. 1, p. 69–85, doi:10.1038/nrd2487, 2009.

MOLINSKI, T. F. NMR of natural products at the “nanomole-scale”. **Natural product reports**, v. 27, n. 3, p. 321–9, doi:10.1039/b920545b, 2010.

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, 1983.

NEWMAN, D. J. e 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, doi:10.1021/np200906s, 2012.

NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI). Disponível em: <<http://www.cancer.gov/researchandfunding/priorities/global-research-activities>>. Acesso em: 15.mai.2014.

OGAWA, H. et al. UCH9, a new antitumor antibiotic produced by *Streptomyces*: I. Producing organism, fermentation, isolation and biological activities. **The Journal of antibiotics**, v. 51, n. 3, p. 261–6, 1998.

OLANO, C.; MÉNDEZ, C. e SALAS, J. a. Antitumor compounds from marine actinomycetes. **Marine drugs**, v. 7, n. 2, p. 210–48, doi:10.3390/md7020210, 2009.

OLIVERA, B. M. et al. Peptide neurotoxins from fish-hunting cone snails. **Science (New York, N.Y.)**, v. 230, n. 4732, p. 1338–43, 1985.

ÖZCAN, K. et al. Diversity and antibiotic-producing potential of cultivable marine-derived actinomycetes from coastal sediments of Turkey. **Journal of Soils and Sediments**, v. 13, n. 8, p. 1493–1501, doi:10.1007/s11368-013-0734-y, 2013.

PHAM, V. H. T. e KIM, J. Cultivation of unculturable soil bacteria. **Trends in biotechnology**, v. 30, n. 9, p. 475–84, doi:10.1016/j.tibtech.2012.05.007, 2012.

PIEL, J. Metabolites from symbiotic bacteria. **Natural product reports**, v. 26, n. 3, p. 338–62, doi:10.1039/b703499g, 2009.

POMMIER, Y. et al. DNA sequence- and structure-selective alkylation of guanine N2 in the DNA minor groove by ecteinascidin 743, a potent antitumor compound from the Caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata*. **Biochemistry**, v. 35, n. 41, p. 13303–9, doi:10.1021/bi960306b, 1996.

PRIETO-DAVÓ, A. et al. Targeted search for actinomycetes from nearshore and deep-sea marine sediments. **FEMS microbiology ecology**, v. 84, n. 3, p. 510–8, doi:10.1111/1574-6941.12082, 2013.

RADJASA, O. K. et al. Highlights of marine invertebrate-derived biosynthetic products: their biomedical potential and possible production by microbial associates. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 19, n. 22, p. 6658–74, doi:10.1016/j.bmc.2011.07.017, 2011.

RAMESH, S.; RAJESH, M. e MATHIVANAN, N. Characterization of a thermostable alkaline protease produced by marine *Streptomyces fungicidicus* MML1614. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 32, n. 6, p. 791–800, doi:10.1007/s00449-009-0305-1, 2009.

RATH, C. M. et al. Meta-omic characterization of the marine invertebrate microbial consortium that produces the chemotherapeutic natural product ET-743. **ACS chemical biology**, v. 6, n. 11, p. 1244–56, doi:10.1021/cb200244t, 2011.

ROHR, J.; MÉNDEZ, C. e SALAS, J. a. The Biosynthesis of Aureolic Acid Group Antibiotics. **Bioorganic Chemistry**, v. 27, n. 1, p. 41–54, doi:10.1006/bioo.1998.1110, 1999.

SASTRY, M. e PATEL, D. J. Solution structure of the mithramycin dimer-DNA complex. **Biochemistry**, v. 32, n. 26, p. 6588–604, 1993.

SCHWARTZ, G. K. e SHAH, M. a. Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 23, n. 36, p. 9408–21, doi:10.1200/JCO.2005.01.5594, 2005.

SOUSA, T. da S. et al. Anthracyclines from *Micromonospora* sp. **Journal of natural products**, v. 75, n. 3, p. 489–93, doi:10.1021/np200795p, 2012.

SUBRAMANI, R. e AALBERSBERG, W. Marine actinomycetes: An ongoing source of novel bioactive metabolites. **Microbiological research**, v. 167, n. 10, p. 571–80, doi:10.1016/j.micres.2012.06.005, 2012.

SUBRAMANI, R. e AALBERSBERG, W. Culturable rare Actinomycetes: diversity, isolation and marine natural product discovery. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 21, p. 9291–321, doi:10.1007/s00253-013-5229-7, 2013.

SUDEK, S. et al. Identification of the putative bryostatin polyketide synthase gene cluster from “Candidatus Endobugula sertula”, the uncultivated microbial symbiont of the marine bryozoan *Bugula neritina*. **Journal of natural products**, v. 70, n. 1, p. 67–74, doi:10.1021/np060361d, 2007.

TAKEARA, R. et al. Constituintes químicos da ascídia *didemnum psammatodes* (sluiter, 1895) coletada na costa cearense. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1179–1181, doi:10.1590/S0100-40422007000500024, 2007.

TAKEARA, R. et al. Antileukemic effects of *Didemnum psammatodes* (Tunicata: Ascidiacea) constituents. **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology**, v. 151, n. 3, p. 363–9, doi:10.1016/j.cbpa.2007.02.011, 2008.

VICENTE, J. et al. Biodiversity of actinomycetes associated with Caribbean sponges and their potential for natural product discovery. **Marine biotechnology (New York, N.Y.)**, v. 15, n. 4, p. 413–24, doi:10.1007/s10126-013-9493-4, 2013.

WATERS, A. L. et al. The expanding role of marine microbes in pharmaceutical development. **Current opinion in biotechnology**, v. 21, n. 6, p. 780–6, doi:10.1016/j.copbio.2010.09.013, 2010.

WEINHEIMER, A. J. e SPRAGGINS, R. L. The occurrence of two new prostaglandin derivatives (15-epi-PGA<sub>2</sub> and its acetate, methyl ester) in the gorgonian *Plexaura homomalla* chemistry of coelenterates. XV. **Tetrahedron letters**, n. 59, p. 5185–8, 1969.

WHITE, E. e DIPAOLA, R. S. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 15, n. 17, p. 5308–16, doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-5023, 2009.

WILKE, D. V. et al. Cytotoxic lipidic  $\alpha$ -amino acids from the zoanthid *Protopalythoa variabilis* from the Northeastern coast of Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 8, p. 1455–1459, doi:10.1590/S0103-50532009000800010, 2009.

WILKE, D. V. et al. Pro-apoptotic activity of lipidic  $\alpha$ -amino acids isolated from *Protopalythoa variabilis*. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 18, n. 22, p. 7997–8004, doi:10.1016/j.bmc.2010.09.027, 2010.

WILLIAMS, G. H. e STOEBER, K. The cell cycle and cancer. **The Journal of pathology**, v. 226, n. 2, p. 352–64, doi:10.1002/path.3022, 2012.

WILLIAMS, P. G. Panning for chemical gold: marine bacteria as a source of new therapeutics. **Trends in biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 45–52, doi:10.1016/j.tibtech.2008.10.005, 2009.

WU, X. et al. Taxonomic study of a chromomycin-producing strain and reclassification of *Streptomyces cavourensis* subsp. *washingtonensis* as a later synonym of *Streptomyces griseus*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 58, n. Pt 12, p. 2783–7, doi:10.1099/ijs.0.65628-0, 2008.

XIONG, Z.-Q. et al. Characterization of *Streptomyces padanus* JAU4234, a producer of actinomycin X2, fungichromin, and a new polyene macrolide antibiotic. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 2, p. 589–92, doi:10.1128/AEM.06561-11, 2012.

XIONG, Z.-Q. et al. Recent advances in the discovery and development of marine microbial natural products. **Marine drugs**, v. 11, n. 3, p. 700–17, doi:10.3390/md11030700, 2013.

ZOTCHEV, S. B. Marine actinomycetes as an emerging resource for the drug development pipelines. **Journal of biotechnology**, v. 158, n. 4, p. 168–75, doi:10.1016/j.jbiotec.2011.06.002, 2012.

## ANEXO I – Composição dos meios de cultura para microrganismos

### Meio A1 enriquecido (A1T) para 1 L

Amido.....	10 g
Extrato de levedura.....	4 g
Peptona.....	2 g
CaCO <sub>3</sub> .....	400 mg
KBr (20 g/L).....	5 mL
FeSO <sub>4</sub> (8 g/L).....	5 mL
Água do mar filtrada.....	750 mL
Água destilada.....	250 mL

### Meio Soybean (SB) para 1 L

Amido.....	10 g
Soybean-caseína.....	20 g
Glicose.....	10 g
Sal marinho.....	25 g
Água destilada.....	1 L

### Meio Soytone (ST) para 1 L

Amido.....	10 g
Soytone.....	20 g
Glicose.....	10 g
Sal marinho.....	25 g
Água destilada.....	1 L