



**LUCIANA PEREIRA DE SOUZA BERMEJO**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
PROLIFERATIVA E INIBITÓRIA DE  
EXTRATOS E FRAÇÕES DE  
MICRORGANISMOS MARINHOS SOB  
CÉLULAS MCF-7**

**LAVRAS - MG  
2014**

**LUCIANA PEREIRA DE SOUZA BERMEJO**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROLIFERATIVA E INIBITÓRIA DE  
EXTRATOS E FRAÇÕES DE MICRORGANISMOS MARINHOS SOB  
CÉLULAS MCF-7**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Microbiologia Agrícola, área de  
concentração em Microbiologia Agrícola, para a  
obtenção do título de Doutor.

Orientadora

Dra. Sára Maria Chalfoun

Coorientadores

Dr. Pinhua Liu

Dr. John Snyder

**LAVRAS - MG**

**2014**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e  
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Bermejo, Luciana Pereira de Souza.

Avaliação da atividade proliferativa e inibitória de extratos e frações de microrganismos marinhos sobre células MCF-7 / Luciana Pereira de Souza Bermejo. – Lavras : UFLA, 2014.

97 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Sara Maria Chalfoun.

Bibliografia.

1. Microrganismos marinhos. 2. Metabólitos secundários. 3. Compostos bioativos. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 589.2

**LUCIANA PEREIRA DE SOUZA BERMEJO**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROLIFERATIVA E INIBITÓRIA DE  
EXTRATOS E FRAÇÕES DE MICRORGANISMOS MARINHOS SOB  
CÉLULAS MCF-7**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Microbiologia Agrícola, área de  
concentração em Microbiologia Agrícola, para a  
obtenção do título de Doutor

Aprovada em 26 de fevereiro de 2014.

Dra. Caroline Lima Angélico	UFLA
Dr. Luis Roberto Batista	UFLA
Dr. Rafael Cesar Russo Chagas	UFSJ
Dr. Rodrigo Luz da Cunha	EPAMIG

Dra. Sára Maria Chalfoun  
Orientadora

**LAVRAS - MG  
2014**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus que iluminou meu caminho e permitiu que eu chegasse até aqui.

Agradeço em especial três pessoas que contribuíram para que a pós-graduação em nível de mestrado e doutorado se tornasse realidade em minha vida: minha orientadora professora doutora Sára Maria Chalfoun por ter acreditado e me acolhido como sua orientanda (a você querida orientadora, a minha admiração e apreço); ao meu marido Paulo Henrique de Souza Bermejo pelo apoio incondicional em todos os momentos, companheirismo, amor e dedicação imensurável e a minha querida filha Laura, pela motivação e compreensão. Aos três agradeço imensamente e desejo que a Luz Divina os abençoe sempre.

O meu agradecimento aos meus coorientadores prof. Dr. John Snyder e prof. Dr. Pinhua Liu por terem me recebido e me orientado na Universidade de Boston/EUA durante a realização do meu doutorado sanduíche.

Sou grata à minha família a quem devo grande parte de quem sou e por terem me ensinado o significado de valores humanos inestimáveis, os quais trago sempre em minha vida. A meu pai Márcio, minha mãe Siomara, minhas avós Enir e Manuela, minha irmã Érica e meu irmão Gabriel a minha gratidão por terem possibilitado e incentivado a carreira profissional, contribuindo em todos os sentidos para com a minha formação.

Meus agradecimentos à CAPES pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa.

Gostaria de externar meus agradecimentos aos professores do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Lavras pelo apoio.

Agradeço a todos os meus colegas de laboratório da EPAMIG, em especial à Deila, Caroline e Vicentina pela amizade, conselhos, incentivos e apoio. Sou grata também aos meus colegas e amigos do laboratório de Produtos Naturais da Universidade de Boston/EUA pela paciência, compreensão e amizade, externando aqui o meu apreço e reconhecimento.

Sou também muito grata aos professores Dr. Luis Batista, Dr. Rodrigo Cunha, Dr. Rafael Augusto e Dr. Hudson Teixeira que dedicaram parte de seu importante tempo contribuindo para a concretização deste trabalho.

Concluindo, sou grata a todos que de uma maneira ou outra contribuíram para a realização desta pesquisa.

## RESUMO

Os microrganismos marinhos têm despertado o interesse de pesquisadores de várias partes do mundo por representarem uma fonte diferenciada de metabólitos secundários, devido às condições ambientais as quais esses microrganismos estão sujeitos. Microrganismos marinhos representam uma fonte rica de moléculas estruturalmente diversificadas, entretanto o uso desta fonte para a investigação de compostos bioativos tem sido pouco explorado. Este trabalho teve como objetivo isolar linhagens de fungos e actinomicetos extraídos do oceano no Sul da China que permitam avaliar o potencial produtivo de compostos bioativos. Para isto, foram isoladas 5.000 linhagens cultivadas em meio de cultura líquida e obtidos 36 extratos com diferentes solventes orgânicos. Estes extratos foram avaliados por ensaios de atividade biológica (*screening*) com células cancerígenas (MCF-7). Entre todos os microrganismos investigados neste estudo sob as células MCF-7, os actinomicetos (*Streptomyces* sp.) MS122(R) e A26se destacaram, respectivamente, por exercer atividade proliferativa e atividade citotóxica. A identificação de atividade proliferativa com o MS122(R) contribui diretamente para subsidiar avanços em estudos sobre toxinas associadas ao desenvolvimento e crescimento de células cancerígenas. Já a identificação de atividade citotóxica com o A26 contribui diretamente para a descoberta de novos fármacos inibindo o crescimento de células MCF-7.

Palavras-chave: Microrganismos marinhos. Metabólitos secundários. Compostos bioativos

## ABSTRACT

Marine microorganisms have attracted the interest of researchers in various parts of the world because they represent a different source of secondary metabolites, due to environmental conditions that these organisms are subject. Marine organisms represent a rich source of structurally diverse molecules, however the use of this source for research of bioactive compounds has been little explored. This work aims to isolate strains of fungi and actinomycetes extracted from the ocean in South China to evaluate the productive potential of bioactive compounds. For this, we isolated 5,000 strains grown in liquid culture medium and 36 extracts obtained with different organic solvents. These extracts were evaluated by testing the biological activity (screening) with cancer cells (MCF - 7). Among all microorganisms investigated in this study under the MCF - 7 cells, the MS122 (R) A26 and actinomycetes (*Streptomyces* sp.) showed respectively, to exert proliferative activity and cytotoxicity. The identification of proliferative activity with MS122 (R) contributes directly to support advances in studies on toxins associated to the development and growth of cancer cells. Further, the identification of cytotoxic activity with the A26 directly contributes to the discovery of new drugs inhibiting the growth of MCF - 7 cells.

Keywords: Marine microorganisms. Secondary metabolites. Bioactives compounds.



## LISTA DE FIGURA

Figura 1	Metabólitos secundários ativos isolados de fungos marinhos.....	31
Figura 2	Processo de extração de compostos bioativos a partir de microrganismos à obtenção de frações. ....	47
Figura 3	Crescimento de colônias de actinomicetos e fungos MF156 em meios Gauze e BDA respectivamente.....	59
Figura 4	Isolado A-26 em meio Gauze.....	60
Figura 5	Isolado MS122 meio de cultura Gauze.....	60
Figura 6	Crescimento de células MS122 e A-26 em pequena escala.....	61
Figura 7	Crescimento de células MS122 e A-26 em larga escala, meios de cultura: M004 medium e F-medium .....	62
Figura 8	Células/micélio da amostra A-26 após processo de filtração.....	63
Figura 9	Processo de extração de compostos bioativos a partir da amostra A-26 à obtenção de frações e suas respectivas massas. ...	64
Figura 10	Frações da amostra A-26 obtidas após etapa de extração com diferentes solventes (acetato de etila, metanol, butanol) .....	65
Figura 11	Processo de extração de compostos bioativos a partir da amostra MS122 à obtenção de frações e suas respectivas massas.....	66
Figura 12	Frações da amostra MS122 obtidas após etapa de extração com diferentes solventes (acetato de etila, metanol, butanol).....	67

Figura 13	Processo de extração de compostos bioativos a partir da amostra MS122 (R) à obtenção de frações e suas respectivas massas.....	68
Figura 14	Frações da amostra MS122 (R) obtidas após etapa de extração com diferentes solventes (acetato de etila, metanol, butanol).....	69
Figura 15	Processo de extração de compostos bioativos a partir da amostra MF156 à obtenção de frações e suas respectivas massas.....	70
Figura 16	Frações MF156 obtidas após etapa de extração com diferentes solventes (acetato de etila, metanol, butanol) .....	71
Figura 17	Comportamento da absorvância de diferentes concentrações de células MCF-7 em 200 µl de cultura de células.....	72
Figura 18	Comportamento da absorvância de diferentes concentrações de células MCF-7 em 100 µl de cultura de células.....	73
Figura 19	Status de crescimento de células MCF-7 .....	74
Figura 20	Atividade bioativa sobre células de câncer (MCF7) por metabólitos marinhos microbianos.....	76
Figura 21	Atividade bioativa sobre células de câncer (MCF7) por metabólitos marinhos microbianos.....	78

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Novos metabólitos produzidos por actinomicetos marinhos entre 2005-2010 .....	38
Quadro 2	Amostras e respectivos meios de cultura.....	43

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Números de células e volume da cultura de MCF-7 antes do tratamento com MTT.....	55
Tabela 2	Análise de dados para curva de crescimento de células MCF-7 em 200 µl de cultura de células.....	72
Tabela 3	Análise de dados da curva de crescimento de células MCF-7 em 100 µl de cultura de células.....	73
Tabela 4	Número e nome das amostras/ metabólitos microbianos marinhos .....	75
Tabela 5	Inibição e/ou estimulação das frações sobre a proliferação de células do câncer de mama MCF-7 .....	79
Tabela 6	Resumo dos resultados dos testes Drug Screening.....	81

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>18</b>
<b>2.1</b>	<b>Produtos naturais de microrganismos marinhos</b> .....	<b>18</b>
<b>2.2</b>	<b>Biotoxicologia e toxinas</b> .....	<b>22</b>
<b>2.3</b>	<b>Metabólitos secundários obtidos de microrganismos marinhos</b> ....	<b>26</b>
<b>2.4</b>	<b>Identificação de compostos obtidos a partir de fungos marinhos</b> .....	<b>29</b>
<b>2.5</b>	<b>Metabólitos secundários produzidos por Actinomicetos</b> .....	<b>32</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>40</b>
<b>3.1</b>	<b>Isolamento de microrganismos marinhos</b> .....	<b>40</b>
<b>3.2</b>	<b>Purificação e caracterização das linhagens</b> .....	<b>41</b>
<b>3.3</b>	<b>Preservação</b> .....	<b>41</b>
<b>3.4</b>	<b>Preparo de cepas marinhas</b> .....	<b>42</b>
<b>3.5</b>	<b>Crescimento/fermentação de células em pequena escala</b> .....	<b>43</b>
<b>3.6</b>	<b>Crescimento/fermentação de células em larga escala</b> .....	<b>44</b>
<b>3.7</b>	<b>Processo de extração de cepas marinhas</b> .....	<b>44</b>
<b>3.8</b>	<b>Cultura de células do câncer (MCF-7)</b> .....	<b>47</b>
<b>3.8.1</b>	<b>Materiais e reagentes da cultura de células do câncer</b> .....	<b>48</b>
<b>3.8.1.1</b>	<b>Materiais</b> .....	<b>48</b>
<b>3.8.1.2</b>	<b>Reagentes</b> .....	<b>48</b>
<b>3.8.2</b>	<b>Procedimentos</b> .....	<b>50</b>

3.8.2.1	Cultura de células.....	50
3.8.3	Subcultura de células cancerosas.....	51
3.8.4	Criopreservação de células cancerosas.....	52
3.9	Testes “Drug Screening” com frações de cepas marinhas .....	53
3.10	Ensaio MTT (Meio de cultura Brometo de Tiazolil Azul de Tetrazólio) .....	54
3.10.1	Determinação do número apropriado de inoculação de células do câncer para o ensaio de MTT.....	54
3.11	Contagem de células.....	56
3.12	Procedimentos de análise dos dados .....	57
4	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>59</b>
4.1	Resultados do preparo de cepas marinhas .....	59
4.2	Fermentação em meio líquido em pequena escala.....	61
4.3	Fermentação em meio líquido em larga escala.....	61
4.4	Processo de extração de cepas marinhas .....	62
4.5	Frações obtidas a partir dos processos de extração de cepas marinhas.....	64
3.6	Efeitos das frações de estirpes marinhas sobre o crescimento de células cancerosas MCF-7 .....	71
3.7	Resultados dos testes <i>Drug Screening</i> dos metabólitos marinhos microbianos.....	74
3.8	Resultados dos Testes Drug Screening .....	81
4	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>83</b>

<b>REFERÊNCIAS</b> .....	84
--------------------------	----

## 1 INTRODUÇÃO

Como fonte infinita de novos compostos químicos, a diversidade microbiana marinha vem se destacando em Inovação Biotecnológica, sendo os microrganismos marinhos considerados como um grupo potencial para a descoberta de novas substâncias e compostos bioativos (BERDY, 2005; FENICAL; JENSEN, 2006).

A busca de princípios bioativos de microrganismos marinhos é uma das práticas que mais tem recebido investimento nos países desenvolvidos, principalmente em pesquisas relacionadas à bioprospecção realizadas por indústrias farmacêuticas, biotecnológicas, agrícolas e indústrias alimentícias (SIPKEMA et al., 2005).

Para o processo de busca destes produtos naturais úteis, é necessário um repertório diverso e menos explorado de microrganismos que permitam obter uma grande variedade de metabólitos novos. Frente a imensa diversidade biológica marinha, é crescente o número de descobertas e reconhecimento de entidades químicas neste ambiente (JENSEN, 2010).

Dentre inúmeros microrganismos marinhos, destacam-se os actinomicetos. Estes são bactérias Gram-positivas produtores de esporos, considerados como fontes praticamente ilimitadas de novos compostos com muitas aplicações terapêuticas mantendo uma posição de destaque devido à sua diversidade e capacidade comprovada para a produção de novos compostos. Atualmente, o estudo de actinomicetos é de interesse significativo para a



descoberta de compostos relevantes para áreas como farmacologia, biotoxicologia e biotecnologia.

De acordo com relatos na literatura, vários compostos de actinomicetos têm sido isolados e caracterizados incluindo os aminoglicosídeos, antraciclinas, glicopeptídeos, beta-lactâmicos, macrólídeos, nucleósidos, peptídeos, polienos, poliésteres e tetraciclinas (BERDY, 2005).

Baker et al. (2007) afirmam que os fungos marinhos têm sido amplamente estudados, sobretudo devido à seus metabólitos bioativos e também por representarem uma rica e promissora fonte de novos anticancerosos, antibacterianos, antiplasmódica, agentes anti-inflamatórios e antivirais.

À exploração do potencial destes microrganismos, tendo em vista a produção de novos compostos, o isolamento se torna essencial. Embora as estratégias de isolamento dirigidas para novos derivados marinhos sejam escassas, progressos têm sido observados na área de enriquecimento usando técnicas e métodos de seleção e novos meios (MAGARVEY et al., 2004; JENSEN et al., 2005; MINCER; FENICAL; JENSEN, 2005; BREDHOLDT et al., 2007; QIU; RUAN; HUANG, 2008; SUN et al., 2010; VELHO-PEREIRA; KAMAT, 2010; KHANNA; SOLANKI; LAL, 2011).

Deve-se considerar ainda, que tais pesquisas se concentram e se restringem à caracterização dos compostos, enquanto que a identificação dos mecanismos de ação é fundamental para que as substâncias sintetizadas por estes microrganismos possam ser úteis para a biotecnologia.

Neste contexto, considerando a relevância dos metabólitos secundários

de microrganismos marinhos e potencial de contribuição para diferentes áreas tais como farmacologia e biotoxologia, esta pesquisa tem como objetivo geral isolar fungos e actinomicetos (*Streptomyces*) marinhos originados do Sul da China e avaliar seu potencial produtivo de compostos bioativos.

Para alcançar este objetivo geral, foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- a) Possibilitar o crescimento de linhagens isoladas e geração de extratos e frações;
- b) Realizar testes biológicos com as frações em células cancerígenas MCF-7;
- c) Identificar potenciais produtores de moléculas bioativas; e
- d) Analisar o perfil químico da fração com diferente potencial biológico.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Produtos naturais de microrganismos marinhos**

No Brasil, a pesquisa química de metabólitos dos microrganismos marinhos iniciou-se na década de 60 com o isolamento de um derivado de aminoácido de uma espécie inédita de actinomiceto. Atualmente, os trabalhos publicados em diversos periódicos têm se concentrado nas áreas de identificação estrutural dos compostos isolados e suas atividades com interessantes aplicações na área química, em múltiplos setores produtivos da indústria alimentícia, agroquímica, em ensaios citotóxicos e também antibióticos (EPIFANIO; MAIA; FENICAL, 2000).

Após anos de intensa pesquisa, a química de produtos naturais marinhos tornou-se um campo maduro, sendo os oceanos considerados como uma importante fonte de drogas com importantes classes de microrganismos originários deste ambiente. Durante a última década, com o desenvolvimento de novas técnicas de mergulho e máquinas, tornou-se possível coletar as amostras marinhas de águas a 900 m abaixo do mar e com isso muitos compostos promissores, com novas estruturas e complexos, foram isolados a partir dos oceanos (ZHANG et al., 2010).

O estudo das substâncias químicas produzidas pelas espécies marinhas é fundamental para compreensão da evolução e da manutenção das comunidades marinhas nos diferentes oceanos. Algumas das atividades mais comumente

atribuídas aos produtos naturais de microrganismos marinhos são os da mediação na reprodução, de defesa contra potenciais predadores, patógenos, bioincrustação, ou competidores de substratos (PROKSCH; EDRADA-EBEL; EBEL, 2003).

Muitas substâncias identificadas possuem estruturas químicas únicas e sem precedentes em fontes naturais terrestres, fato que tem motivado, além do desenvolvimento de novos métodos de isolamento e de síntese orgânica a partir de microrganismos marinhos, pesquisas sobre (a) origem e síntese de substâncias, (b) sua importância ecológica e (c) atividades farmacológicas (LIU et al., 2010).

Frente à necessidade de isolamento e obtenção de quantidades suficientes destas substâncias sintetizadas para a realização de estudos clínicos e posterior produção em larga escala de fármaco, os microrganismos apresentam vantagens diante de outros organismos marinhos devido à possibilidade de realização de processos fermentativos com estes microrganismos. Corroborando com esta vantagem está a convicção de alguns pesquisadores que a verdadeira fonte de alguns dos metabólitos ativos seja, na verdade, as comunidades microbianas que vivem em simbiose com organismos marinhos (PROKSCH; EDRADA-EBEL; EBEL, 2003; LI, 2009).

O papel dos produtos naturais, no desenvolvimento de novos fármacos, tem sofrido muitas mudanças nos últimos 30 anos com um notável declínio do interesse das maiores indústrias farmacêuticas a partir da metade dos anos 90. Nos últimos 5 anos, porém, houve o renascimento desse campo de pesquisa com

o emprego de novas técnicas analíticas, espectroscópicas e a prospecção de atividades biológicas por *high-throughput screening* (Baker et al., 2007; LAM, 2007; MOLINSKI et al., 2009). No entanto, 80% dos fármacos que estão em uso são ou foram inspirados em produtos naturais estudados da forma clássica (COSTA-LOTUFO; MONTENEGRO; MORAES, 2008).

Kelecom (2002) observou que os estudos sobre microrganismos marinhos têm sido focados em bactérias e fungos relacionados com a produção de metabólitos secundários. Esses microrganismos geralmente são isolados da água do mar, sedimentos, peixes, algas e principalmente de invertebrados marinhos, como esponjas, moluscos, tunicados, celenterados e crustáceos. Este mesmo autor também observou, em trabalhos anteriores, que as fontes de microrganismos escolhidos seguem duas abordagens distintas: abordagens com propósitos bem definidos, tais como obtenção de metabólitos alvo ou estudo da química envolvida em que os microrganismos são obtidos de algas, invertebrados e peixes; e abordagens aleatórias, que usa qualquer material disponível para o isolamento de microrganismos como água do mar, sedimentos, conteúdo gastrointestinal de peixes, pedaços de materiais flutuantes.

Importante ressaltar que os produtos naturais isolados de microrganismos, de uma forma geral, têm uma importância sem precedentes não somente para uso na forma de medicamentos (exemplo antibióticos), mas, principalmente na forma de agroquímicos menos prejudiciais à saúde humana (MOLINSKI et al., 2009).

Embora, atualmente, poucos medicamentos disponíveis no mercado

possuam como princípio ativo moléculas provenientes do meio marinho, muitos estão sendo destaques dos estudos clínicos (THAKUR et al., 2008). No período de 1998–2006, os estudos pré-clínicos incluíram 592 compostos derivados de fontes marinhas considerando as atividades antitumoral e citotóxica, e 666 substâncias com outras atividades relacionadas tais como antibacteriana, anticoagulante, antiinflamatória, antifúngica, anti-helmíntica, antiplaquetária, antiprotozoária e antiviral; ação nos sistemas cardiovascular, endócrino, imune e nervoso (MAYER et al., 2010).

Somente nas últimas décadas é que as funções ecológicas começaram a ser comprovadas experimentalmente, inclusive por pesquisadores brasileiros, revelando papéis importantes na estruturação dos ecossistemas e dando origem a outras hipóteses envolvendo o papel de metabólitos secundários afetando a biodiversidade (LI, 2009).

Os trabalhos publicados por pesquisadores brasileiros de produtos naturais de microrganismos estão computados em 31 grupos. Sendo esses relacionados às áreas de isolamento e síntese de metabólitos com atividade biológica em interfaces com biotecnologia e biotransformação, controle biológico e bioprospecção.

Destas interfaces podem surgir respostas a estudos mediados por pequenas moléculas e atividades biológicas despertando a potencial contribuição para áreas como toxicologia e biotoxicologia (MIAO; QIAN, 2005).

## 2.2 Biotoxicologia e toxinas

De acordo com inúmeros relatos na literatura, muitos dos metabólitos isolados de invertebrados marinhos são, na verdade, produzidos por microrganismos associados. Sem dúvida, a simbiose ou o comensalismo que plantas e animais marinhos mantêm com vários microrganismos é uma relação ecológica bem conhecida e amplamente documentada (ZHANG et al., 2004).

Os microrganismos marinhos desenvolveram um aparato metabólico bastante peculiar que é, de certo modo, muito mais difuso que o de seres multicelulares. Essa interessante capacidade adaptativa não só garantiu a sua sobrevivência em ambientes às vezes extremos, como também proporcionou um recurso para a produção de metabólitos nunca antes observados para organismos terrestres (KELECOM, 2002).

Os microrganismos marinhos possuem capacidade de se multiplicar, produzindo biomassa considerável, além de metabólitos secundários com capacidade toxicológica. Assim como já foram isoladas substâncias quimicamente semelhantes a partir de organismos filogeneticamente distantes, outras originadas por vias biossintéticas completamente distintas achavam-se presentes numa mesma espécie (WILLIAMS, 2009).

Dentre esta riqueza de biodiversidade, podem-se encontrar diversos tipos de compostos ativos importantes tanto para farmacologia quanto para biotoxicologia.

Biotoxicologia é uma área em que se estuda a vertente mecânica e

molecular da interação dos xenobióticos (compostos químicos estranhos a um sistema biológico) com os organismos vivos desenvolvendo a capacidade de avaliação de risco e comunicação de risco.

No campo da pesquisa biotóxica, a especificação química representa um desafio analítico em muitos aspectos metodológicos e éticos. Isto se deve a fatores tais como a reconhecida complexidade dos materiais biológicos, os níveis de concentração de substâncias, em geral, muito baixos, a necessidade do entendimento do papel de cada forma específica nos processos fisiológicos e patológicos, a disponibilidade de métodos analíticos que atendam aos requisitos de qualidade aceitáveis, a praticabilidade e os aspectos éticos da amostragem (APOSTOLI, 1998; MUTTI, 1999).

O envolvimento do homem em acidentes ou intoxicações por qualquer substância produzida por organismos e/ou microrganismos vivos, faz-se necessário que esta exerça alguma influência química em um ou mais constituintes das suas células a fim de produzir uma resposta biológica. Em outras palavras, é necessário que as moléculas dessas substâncias fiquem muito próximas das moléculas celulares para que o funcionamento destas seja alterado. Por outro lado, a identificação de compostos naturais com efeito proliferativo e/ou citotóxico, tem sido alvo de pesquisa por diversos grupos da área de fitofármacos. Um levantamento de 1010 drogas com indicação clínica durante um período de 25 anos (1981-2006) mostrou que 43 fármacos (4,25%) são de origem natural e que, dentre estes, oito possuem ação estimuladora ou supressora sobre o sistema imune (NEWMAN; CRAGG, 2007).



Em muitas ocasiões, os produtos naturais se mostram inativos, muito tóxicos ou ainda com bioatividades indesejadas. Em alguns casos é possível, através de transformações químicas, potencializar a atividade farmacológica esperada e/ou reduzir outras que estão relacionadas à toxicidade do composto (HOSTETTMANN; HAMBURGER, 1994).

Muitos compostos químicos apresentam diferentes espécies com toxicidade e metabolismo também diferenciados. Portanto, para entender e avaliar os mecanismos de interação entre os elementos químicos e seus alvos biológicos, a identificação e a quantificação desses elementos, em muitos casos não são suficientes. É necessário o conhecimento das formas químicas através dos estudos de especiação química (APOSTOLI, 1998).

A partir dos anos 70, de acordo com os principais bancos de dados biotoxicológicos, as pesquisas sobre monitoramento biológico aumentaram exponencialmente. Os principais fatores que provocaram esse avanço acentuado foram os interesses nas atividades de prevenção, entendidas como principal meio para limitar as patologias correlacionadas ao ambiente, a suposta associação entre alguns parâmetros biológicos e as alterações do estado de saúde e o extraordinário desenvolvimento das técnicas analíticas, que permitiram quantificar parâmetros biotecnológicos até pouco tempo inimagináveis (PIVETTA et al., 2001).

As definições de natureza biotoxicológica reconhece a capacidade do monitoramento biológico de uma avaliação direta da quantidade de substância química efetivamente absorvida e seu risco à saúde. Com isso pode-se antever

uma utilidade no estudo da distribuição de parâmetros toxicológicos a correlacionar com suas fontes, causas ou com efeitos, comprovados ou suspeitos, sobre a saúde podendo assim mensurar diretamente a espécie e a distribuição dos tóxicos na população (WIEGAND; PFLUGMACHER, 2005).

A toxicologia tem como principais objetivos identificar os riscos associados a uma determinada substância e determinar em quais condições de exposição esses riscos são induzidos.

Dentre os ramos da toxicologia, destaca-se neste contexto a toxicologia ambiental, a qual se preocupa com o destino das substâncias químicas tóxicas naturalmente encontradas no ambiente como venenos animais e toxinas microbianas, vegetais, seus metabólitos e produtos de degradação no ambiente e nas cadeias alimentares e como são os efeitos desses contaminantes sobre os organismos e populações.

No reino animal as toxinas podem ser divididas em venenos e peçonhas. Os venenos são produtos metabólicos produzidos ou estocados em órgãos que, em condições naturais, afetam o organismo quando ingeridos e podem também atuar, de modo artificial, por via parenteral. Os organismos venenosos primários são aqueles que produzem metabolicamente os venenos como, por exemplo, o dinoflagelado tóxico, *Gonyaulax catenella*, produtor de uma potente toxina. Os animais venenosos secundários adquirem as toxinas através da cadeia trófica, alimentando-se de organismos venenosos primários, por exemplo, os mexilhões podem adquirir a neurotoxina dos dinoflagelados tóxicos através da cadeia alimentar. Os mexilhões passam a ser 'transvetores', e o envenenamento

geralmente é o resultado da ingestão do animal pelo seu predador, tais como os humanos (WANG, 2008).

### **2.3 Metabólitos secundários obtidos de microrganismos marinhos**

Na década de 90 ocorreu um aumento significativo nas investigações destes microrganismos produtores de metabólitos secundários bioativos. Dentre alguns relatos da literatura, Blunt et al. (2009) observaram que a média de trabalhos publicados por ano com microrganismos aumentou 600% quando comparados com o período de 1965-2005 com o ano de 2007. Os autores relataram neste trabalho 958 citações referentes a microrganismos marinhos, fitoplâncton, algas verdes, algas marrons, algas vermelhas, cnidários, briozoários, moluscos, tunicados, equinodermas e plantas de pântano, dos quais 961 novos compostos foram descritos.

A partir de fungos marinhos obrigatórios ou facultativos, Bugni e Ireland (2004) discutiram estratégias de isolamento, crescimento e produção de metabólitos secundários. Os autores observaram que entre as publicações que apresentavam investigação química de fungos derivados de ambiente marinho, cerca de 45% dos isolados foram obtidos de invertebrados, sendo 33% de esponjas enquanto que o restante ficou entre moluscos 5%, tunicados 5%, celenterados 2% e crustáceos 2%.

Os fungos marinhos constituem um dos grupos ecológicos menos estudados (LI; WANG, 2009). Nos últimos anos, a comunidade científica tem se

preocupado com o desenvolvimento de novos medicamentos e estão identificando estes microrganismos como nova fonte para atender a demanda de compostos bioativos e com potencial para uso clínico (SUN et al., 2010).

Uma das propriedades mais importantes dos microorganismos, em especial os fungos, está associada à capacidade metabólica de produzir uma grande diversidade de micromoléculas bioativas. Não obstante, os fungos são responsáveis também pela produção de substâncias altamente tóxicas para mamíferos, conhecidas como micotoxinas, algumas consideradas carcinogênicas potentes. Entre as micotoxinas incluem as aflatoxinas, ocratoxinas, citreoviridinas, tricotecenos e fumonisinas, além de uma variedade de derivados indólicos tremorgênicos (MILLER; TRENHOLM, 1994).

Devido à produção de grande quantidade e diversidade de metabólitos secundários, os fungos são considerados também como uma fonte valiosa de produtos com atividade farmacológica (LI; WANG, 2009).

Pode-se observar também que tais microrganismos também exercem importância no controle biológico de outras áreas, por exemplo, na agricultura. A utilização de produtos obtidos de fungos no controle biológico da agricultura vem crescendo de maneira marcante, destacando neste processo fungos como microherbicidas, micoinseticidas ou fungicidas.

Entretanto, entre vários gêneros de fungos, pesquisadores vêm dando um destaque especial aos aquáticos, ainda pouco estudados, mas, também, uma fonte inesgotável de substâncias bioativas. Estes fungos, como microrganismos competitivos, acumulam uma grande diversidade de micromoléculas, muitas

dessas com atividade biológica de interesse. Fungos derivados do ambiente marinho têm sido objetos de investigações recentes e demonstram ser uma nova e importante fonte de produtos naturais biologicamente ativos.

Nos oceanos, fungos vivem como saprófitas, parasitas e simbiontes em várias matrizes, como areia, troncos, água, bolhas de solo, bem como algas e outros microrganismos. Separação celular, cultura e métodos moleculares biológicos são úteis para esclarecer o aspecto intrigante do metabolismo marinho (ELY; SUPRITA; NAIK, 2004).

Sabe-se que em relação ao equilíbrio do ecossistema marinho, os fungos apresentam grande importância. Por exemplo, os fungos são importantes intermediários do fluxo de energia, entre detritos e níveis tróficos superiores, desempenhando o papel de reciclagem de nutrientes como decompositores. Ademais, enquanto que alguns fungos marinhos causam doenças em animais e plantas, outros desenvolvem relações mutualísticas com tais organismos (WANG, 2006).

Mesmo a ecologia dos fungos marinhos sendo pouco conhecida em relação ao papel ecológico dos fungos terrestres, sabe-se que estes microrganismos de origem marinha possuem importância na reciclagem de nutrientes, na relação de mutualismo com outros organismos marinhos e também como patógenos (BUGNI; IRELAND, 2004).

Muitos estudos envolvendo a ecologia de fungos marinhos foram iniciados devido à patogenicidade de algumas espécies, como por exemplo, as do gênero *Aspergillus*. Algumas espécies desse gênero são consideradas

patógenos de corais (*Gorgonia spp.*), e causam aspergilose, doença que pode acarretar a morte de uma colônia inteira desses invertebrados. Ein-Gil et al. (2009), isolaram de uma esponja sadia, da espécie *Spongia obscura*, uma linhagem de *A. sydowii*. Neste trabalho, os autores sugeriram que estas esponjas, assim como outras, podem servir como reservatório de corais visto à capacidade destes invertebrados em manter conídios viáveis de *A. sydowii* sem adoecer e pelo fato da linhagem isolada ser tão patogênica quanto à isolada de corais doentes.

Os fungos podem participar também de relações de mutualismo no ambiente marinho como é o caso do fungo *Turgidosculum ulvae*, que causa o escurecimento de algumas partes de algas verdes da espécie *Blidingia minima*, que não são predadas por outros organismos. Outro caso é o da alga *Ascophyllum nodosum* e do fungo endossimbionte *Mycosphaerella ascophylli* que aparentemente dependem um do outro para sobreviverem, visto que não são encontrados separadamente na natureza (BUGNI; IRELAND, 2004).

#### **2.4 Identificação de compostos obtidos a partir de fungos marinhos**

Muitos trabalhos da literatura revelam o potencial biológico de fungos marinhos e sua produção de metabólitos secundários. Dentre vários trabalhos, Bugni e Ireland (2004) discutem as estratégias para o isolamento, o crescimento e a produção de metabólitos secundários por parte dos fungos marinhos, enfatizando que a produção dos metabólitos é altamente variável em função das

condições de crescimento, especialmente a salinidade do meio, mas que nem sempre a utilização de meio salino é necessária para a produção de metabólitos. Por fim, destacam as diversas classes de metabólitos isolados (ao todo 273 compostos) e suas atividades biológicas, como:

- a) a dicetopiperazina modificada mactanamida (2), isolada do fungo *Aspergillus* sp. obtido a partir da alga *Sargassum* sp., que apresentou atividade fungistática (Lorenzet al., 1998);
- b) o 9, 10 – diidro – (6R, 11S, 12R, 14R) – coletodiol (3) e o 9, 10 – diidro – (6R, 11R, 12R, 14R) – coletodiol (4), isolados do fungo *Varicosporina ramulosa* obtido da alga *Cytoseira* sp., que apresentaram atividade antifúngica (Hölleret al., 2000);
- c) as ascosalipirrolidinonas A (5) e B (6), isoladas do fungo *Ascochyta salicorniae* obtido a partir da alga *Ulva* sp., das quais o composto **5** apresentou atividade antimalárica contra *Plasmodium falciparum*, atividade antimicrobiana e inibiu a quinase da tirosina p516ck (OSTERHAGE et al., 2000);
- d) a pestalona (7), produzida pelo fungo *Pestalotia* sp., obtido a partir da alga *Rosenvingea* sp. e crescido na presença de um antagonista bacteriano. O composto **7** apresentou potente atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, com MIC de 37 ng/mL, e também contra *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina com MIC de 78 ng/mL (CUETO et al.,

2001);

- e) o fungo endofítico *Drechslera dematioidea*, obtido da alga vermelha *Liagora viscida*, que forneceu dezesseis compostos dos quais nove são sesquiterpenos inéditos (8 – 16), e dois (13 e 15) apresentaram atividade antimalárica (OSTERHAGE et al., 2002);

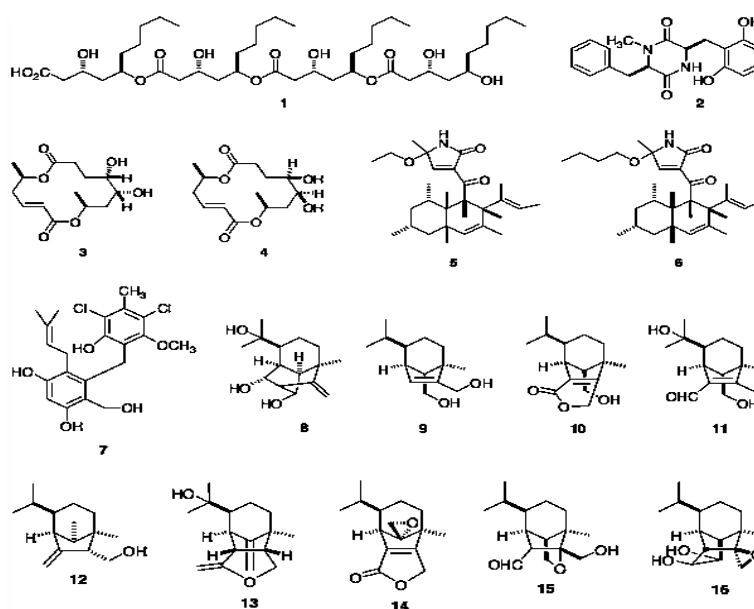


Figura 1 Metabólitos secundários ativos isolados de fungos marinhos

Antibióticos antifúngicos apresentam um número limitado, em relação a seu sítio alvo, cinco classes são conhecidas: os polienos, azoles, alilaminas e tiocarbamatos que atuam sobre o ergosterol presente na membrana e as morfolidinas (equinocardinas) e nucleosídeos análogos (fluopirimidina) inibidores de sintases como glucano sintases e inibidores da síntese de DNA



respectivamente.

Devido a esta produção em grande quantidade e diversidade de metabólitos secundários, os fungos são considerados uma fonte valiosa de produtos com potencial bioativo Bugni e Ireland (2004). Dentre outros microrganismos marinhos produtores de metabólitos secundários com diferentes propriedades destacam-se também os Actinomicetos.

## **2.5 Metabólitos secundários produzidos por Actinomicetos**

Actinomicetos são bactérias Gram-positivas, geralmente filamentosas, conhecidas pela sua capacidade inigualável de produção de metabólitos secundários com diversas atividades biológicas.

São considerados como procariotos, economicamente e biotecnologicamente de interesse, uma vez que são fontes praticamente ilimitadas de novos compostos com muitas aplicações terapêuticas e mantém uma posição de destaque devido à sua diversidade e capacidade comprovada para a produção de novos compostos bioativos (BERDY, 2005), antibióticos (STROHL, 2004), agentes antitumorais (CRAGG; KINGSTON; NEWMAN, 2011), agentes imunossupressivos (MANN, 2001) e enzimas. Esses metabólitos são conhecidos por possuir também propriedades antibacterianas, antifúngicas e anticancerígenas.

Importante destacar também que os actinomicetos têm um papel fundamental no ambiente marinho além da produção de antibióticos (DAS;

LYLA; KHAN, 2006). A degradação e rotação de vários materiais é um processo contínuo, mediado pela ação de uma variedade de microrganismos (JENSEN; MAFNAS, 2006; LAM, 2006). Há uma especulação de que o aumento ou a diminuição de um microrganismo produtor de enzima particular pode indicar a concentração de substrato natural e das condições do meio ambiente (RAMESH; MATHIVANAN, 2009). A atividade celulolítica de actinomicetos marinhos foi descrita por Chandramohan, Ramu e Natarajan (1972), os actinomicetos com atividades foram relatados por Pisano, Sommer e Taras (1992) e várias enzimas industrialmente importantes produzidas por actinomicetos têm sido relatadas (RAMESH; MATHIVANAN, 2009). Actinomicetos são também conhecidos por contribuir para a decomposição e reciclagem de compostos orgânicos (GOODFELLOW; HAYNES, 1984). Além disso, eles desempenham um papel importante na mineralização da matéria orgânica, na imobilização de nutrientes minerais, fixação de nitrogênio e proteção do meio ambiente (GOODFELLOW; WILLIAMS, 1983).

Nos últimos anos, actinomicetos isolados do ambiente marinho (sedimentos, esponjas, tunicados, neuston, etc.) têm atraído considerável atenção (LIU et al., 2010; LANE; MOORE, 2011). Cultura de actinomicetos marinhos é geralmente muito mais difícil de se explorar quando comparados com parentes terrestres, provavelmente devido ao requisito especial de crescimento. No entanto, com o desenvolvimento de técnicas de amostragem, hoje é possível o isolamento e o cultivo de representantes de vários gêneros de actinomicetos marinhos, responsáveis pela produção de novos compostos com atividades

biológicas interessantes (MINCER; FENICAL; JENSEN, 2005).

Como as condições ambientais marinhas são extremamente diferentes das terrestres, os actinomicetos marinhos possuem características diferentes das dos homólogos terrestres e, por conseguinte, podem produzir diferentes tipos de compostos bioativos (IMADA et al., 2007).

As primeiras evidências relatando existência de actinomicetos marinhos vieram a partir da descrição de *Rhodococcus* marinho, primeiro grupo de actinomicetos marinhos caracterizados. Posteriormente veio a descoberta de que algumas cepas marinhas exibem adaptações específicas, enquanto outros parecem ser metabolicamente ativos em sedimentos marinhos (MORAN; RUTHERFORD; HODSON, 1995). No entanto, esses primeiros resultados não geraram entusiasmo suficiente para estimular a busca por novos actinomicetos no ambiente marinho.

A partir de estudos de cultura demonstraram que os actinomicetos marinhos realmente existem nos oceanos (WARD; BORA, 2006) e estes incluem membros dos gêneros *Solwaraspora*, *Salinibacterium*, *Williamsia maris* e *Verrucosipora*, *Dietzia*, *Rhodococcus* (NESTERENKO et al., 1982; HELMKE; WEYLAND, 1984; RAINEY et al., 1995; HEALD et al., 2001), *Streptomyces* (MORAN; RUTHERFORD; HODSON, 1995), *Salinispora* (MALDONADO et al., 2005a; MINCER; FENICAL; JENSEN, 2005), *Marinophilus* (KWON et al., 2006), sendo que ambos requerem água do mar para o crescimento, e *Aeromicrobium marinum* (BRUNS et al., 2003), que também tem um requisito obrigatório para o sal.

Outro gênero recentemente caracterizado: *Salinibacterium* pode tolerar 10% de NaCl, mas não tem uma exigência de sal para o crescimento (HAN et al., 2003). O *Verrucosispora* informado recentemente AB-18-032 (RIEDLINGER et al., 2004) também pode se qualificar como um actinobacteria marinho. Algumas destas espécies foram encontradas para produzir compostos únicos, tais como salinosporamide, que estão agora em ensaios clínicos como agentes anticâncer potentes (FELING et al., 2003).

Os actinomicetos são componentes ativos de comunidades microbianas marinhas (JENSEN et al., 2005a; 2005b) e de forma estável. As populações persistem em diversos ecossistemas marinhos (DAS; LYLA; KHAN, 2006). A descoberta de vários novos táxons de actinomicetos marinhos com atividade metabólica única em seus ambientes naturais (FENICAL; JENSEN, 2006), e sua capacidade de formar populações estáveis em habitats diferentes e produzir novos compostos com várias atividades biológicas (MAGARVEY et al., 2004; LAM, 2006; JENSEN et al., 2007; PRUDHOMME et al., 2008; OLANO; MÉNDEZ; SALAS, 2009; ASOLKAR et al., 2010; RAHMAN et al., 2010) ilustram claramente que actinomicetos marinhos realmente existem nos oceanos e são uma fonte importante de novos metabólitos secundários.

Muitos estudos têm sido feitos sobre o isolamento de actinomicetos de sedimentos marinhos e (LECHEVALIER; LECHEVALIER, 1970) descrevem 32 gêneros baseados na composição química deste habitat marinho. Além disso, a partir de avaliações recentes, *Micromonospora*, *Streptomyces* (MORAN; RUTHERFORD; HODSON, 1995), *Nocardia*, *Rhodococcus* e *Dietzia*

(RAINEY et al., 1995; HEALD et al., 2001), *Prauserella* (KIM; GOODFELLOW, 1999), *Serinicoccus* (XIAO et al., 2011), *Salinispora* (MALDONADO et al., 2005a; MINCER; FENICAL; JENSEN, 2005), *Marinophilus* (LAM, 2006), *Solwaraspora* (MAGARVEY et al., 2004), *Lamerjespora*, *Marinospora* (KWON et al., 2006), *Salinibacterium* (HAN et al., 2003), *Aeromicrobium* (BRUNS et al., 2003), *Williamsia* (STACH et al., 2004), *Verrucosispora* (RIEDLINGER et al., 2004), *Marinactinospora* (TIAN et al., 2009) e *Sciscionella* (TIAN et al., 2009) têm sido relatados a partir do ambiente marinho.

A produção de metabólitos secundários em actinomicetos é muito influenciada por vários parâmetros de fermentação, tais como nutrientes disponíveis (FOURATI-BEN FGUIRA et al., 2005), o pH (SUJATHA; BAPI RAJU; RAMANA, 2005), a pressão parcial de oxigênio (PO<sub>2</sub>) (IWAI; OMURA, 1982), temperatura (SUJATHA; BAPI RAJU; RAMANA, 2005), agitação (BODE et al., 2002), sais minerais, os íons metálicos (GESHEVA; IVANOVA; GESHEVA., 2005), precursores (MARTÍN; DEMAINE, 1980; ŌMURA, 1984), os indutores (DOULL; VINING, 1990; CHENG; FANG; DEMAINE, 1995; DEMAINE; ZHANG, 2005) e inibidores (BIBB, 2005), que muitas vezes podem variar de organismo para organismo (IWAI; OMURA, 1982).

Microrganismos, como os actinomicetos que produzem metabólitos secundários, muitas vezes têm o potencial para produção de vários compostos a partir de uma única espécie. A base molecular para esta observação bem conhecida foi confirmada por vários projetos de sequenciamento de diferentes

microrganismos (SCHIEWE; ZEECK, 1999).

De acordo com (MALDONADO et al., 2005b), os ambientes marinhos contêm uma vasta gama de actinomicetos únicos não presente no ambiente terrestre. E o cultivo destes novos actinomicetos irá facilitar a investigação das suas funções ecológicas e fornecer uma fonte importante para a descoberta de novos metabólitos.

Quadro 1 Novos metabólitos produzidos por actinomicetos marinhos entre 2005-2010

Composto	Fonte	Atividade Biológica	Referências
Chinikomycins Chloro-dihydroquinones	Sreptomycetes Streptomyces sp. Novel	Anticancer Antibacterial;	(Li <i>et al.</i> , 2005)
Glaciapyrroles Frigocyclinone	Streptomyces griseus	Anticancer Antibacterial	(Soria-Mercado <i>et al.</i> , 2005)
Lajollamycin	Streptomyces nodosus	Antibacterial Antibacterial	(Macherla <i>et al.</i> , 2005)
Mechercharmycins	Thermoactinomyces sp. Salinispora tropica	Anticancer □ Anticancer;	(Bruntner <i>et al.</i> , 2005)
Salinosporamide A Sporolide	Salinispora tropica	Antimalarial □	(Manam <i>et al.</i> , 2005)
A Salinosporamides B & C	Salinispora tropica		(Kanoh <i>et al.</i> , 2005)
			(Prudhomme <i>et al.</i> , 2008)
			(Jensen <i>et al.</i> , 2007)
			(Williams <i>et al.</i> , 2005) □

Fonte: Mayer et al., 2011

Os actinomicetos produzem diversos compostos muito complexos exibindo forte potencial bioativo e, geralmente, de baixa toxicidade (BERDY, 2005; KURTBÖKE, 2012). Várias substâncias antimicrobianas de actinomicetos foram isoladas e caracterizadas, como aminoglicosídeos incluindo, antraciclinas, glicopeptídeos, beta-lactâmicos, macrolídeos, nucleosídeos, peptídeos, polienos, poliésteres e tetraciclinas (BERDY, 2005). A maioria dos antibióticos são metabólitos extracelulares que normalmente são secretados no meio de cultura (Bode et al., 2002) e foram utilizados como várias drogas (CHAROENSOPHARAT et al., 2008).

Entre os diferentes microrganismos, actinomicetos são, sem dúvida, os maiores produtores de metabólitos secundários (BERDY, 2005). Entre os metabólitos microbianos conhecidos até o presente, 45% (~10.000 compostos) foram isolados a partir de vários Actinomycetales. Destes compostos Actinomycetales, 75% eram de *Streptomyces* e 25% eram de actinomicetos (BERDY, 2005). A representação de metabólitos de actinomicetos no século 20 foi de apenas 5% (BERDY, 2005).

Após a descoberta da penicilina, em que foi anunciada a era de antibióticos e a percepção de que os microrganismos são uma rica fonte de produtos naturais clinicamente úteis, cerca de 50 mil produtos naturais foram descobertos a partir de microrganismos, mais de 10.000 dos quais são biologicamente ativos (BERDY, 2005). Atualmente, mais de 1000 produtos microbianos são utilizados como antibióticos, agentes antitumorais e agroquímicos (BERDY, 1980; 2005).



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Isolamento de microrganismos marinhos

Microrganismos marinhos, como actinomicetos (*Streptomyces*) e fungos foram coletados a partir de sedimentos marinhos de várias localidades costeiras do Sul da China. Os isolados fazem parte do estoque de microrganismos do laboratório de Microbiologia da Universidade de Boston, estado de Massachusetts – Estados Unidos.

Os fungos isolados foram cultivados em Agar BDA em placas de Petri a 22°C em ambiente escuro. Os fungos foram identificados de acordo com a morfologia microscópica.

No caso de actinomicetos, 1 g da suspensão foi imersa em 10 mL de água do mar esterilizada, centrifugada durante 1 minuto e decantada por 30 minutos. Após 2-3 semanas de crescimento a 28°C em meio Gauze, colônias únicas foram observadas macro/microscopicamente para classificação preliminar a nível de gênero, com base na morfologia.

Para preservação dos microrganismos, foram adicionados a 1 mL de células, após 3 dias de fermentação, 40% de glicerol para armazenamento a 80°C.

### **3.2 Purificação e caracterização das linhagens**

As placas foram examinadas a intervalos regulares de 24h e 48h para facilitar o isolamento das linhagens de fungos e de actinomicetos. A purificação das linhagens isoladas foi realizada pelo método de esgotamento por estrias em placas de Petri contendo meio (BDA) para fungos e meio de cultura Gauze para actinomicetos e por sucessivos repiques até se obter colônias puras.

As colônias de fungos foram caracterizadas de acordo com suas principais características macroscópicas: coloração da colônia; aspecto (algodonoso, pulverulento); e presença de micélio aéreo. Em seguida, as colônias foram nomeadas de acordo com 4 critérios: organismo a partir do qual as linhagens foram isoladas; meio de cultura original do isolamento; método de isolamento; e linhagem.

### **3.3 Preservação**

Após processo de descongelamento, todas as linhagens purificadas foram preservadas de acordo com três metodologias distintas: glicerol 10%, água destilada, e por repique contínuo.

Para a preservação em glicerol 10%, os fungos foram repicados em placas de Petri contendo meio BDA. Após o devido tempo de crescimento, com o auxílio de uma seringa plástica, foram cortados três círculos superficiais de ágar contendo o fungo em várias fases de desenvolvimento. Tais círculos foram

imersos em um Eppendorf etiquetado contendo glicerol 10%, previamente esterilizado. As preservações foram feitas em triplicata e armazenadas em freezer (-80°C).

Para a preservação em água destilada os fungos foram repicados em placas de Petri contendo meio BDA. Após o devido tempo de crescimento, (7 a 10 dias) com o auxílio de uma seringa plástica, foram cortados três círculos superficiais de ágar contendo o fungo em vários estágios de crescimento. Tais círculos foram imersos em um Eppendorf etiquetado contendo água destilada, previamente esterilizada. As preservações foram feitas em triplicata e estocadas em refrigeradores (-80°C).

Para a preservação por repique contínuo, as linhagens fúngicas foram repicadas em tubos de ensaio contendo meio de cultura com ágar.

### **3.4 Preparo de cepas marinhas**

Para o presente estudo foram selecionados quatro isolados, sendo os actinomicetos codificados como A-26, MS122 e MS122 (R) e o fungo codificado como MF156.

Para o crescimento e desenvolvimento de isolados em placa de Petri, a partir de células armazenadas a -80°C, foram pipetados 50 microlitros de células de actinomicetos em meio Gauze (3,75 g/100 mL) e 50 microlitros de suspensão de esporos de fungos em meio BDA. (4 g/100 mL)

As placas foram incubadas a 28°C por 1 semana e a temperatura foi

ajustada para 25-32°C de acordo com a necessidade de crescimento de cada isolado. As amostras e seus respectivos meios de cultura utilizados estão descritos na Tabela 1.

### 3.5 Crescimento/fermentação de células em pequena escala

Das placas incubadas por 1 semana a 28°C, foram inoculadas colônias simples (~0,1 cm<sup>2</sup> com meio sólido contendo fungos e actinomicetos) em meio de cultura LB (Broth, Miller) (1,25 g/50 mL).

Os frascos contendo meio LB + cultura foram submetidos à agitação constante de 170 rpm a 28°C por 2 a 3 dias. A velocidade foi ajustada em 8000 rpm.

Quadro 2 Amostras e respectivos meios de cultura

CÓDIGO DA AMOSTRA	MEIO DE CULTURA	COMPOSIÇÃO DO MEIO
A26 (Actinomiceto)	Gauze	20 g Amido 0,5 g NaCl 0,01 g FeSO <sub>4</sub> 1 g KNO <sub>3</sub> 0,5 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,5 g MgSO <sub>4</sub> 15 g Agar em 1L H <sub>2</sub> O e pH ajustado para 7.3
MF156 (Fungo)	BDA	200g de batata descascada e fatiada; 20g dextrose; 15 g ágar; 1 L água destilada
MS122 (Actinomiceto)	Gauze	
MS122(R) (Actinomiceto)	Gauze acrescido com arroz (1 Kg)	

### 3.6 Crescimento/fermentação de células em larga escala

Após crescimento de células em pequena escala, foi preparado 1 litro dos meios de cultura F- medium (5 g Triptona, 5 g NaCl, 20mg NaF, 10 g extrato de levedura em 1 litro de água destilada) e meio M004 (450 g arroz em 1L de água destilada).

Para as amostras **MF 156** (fungo); **MS122** e **A26** (actinomicetos) 20 mL de crescimento em pequena escala (item 2.5) foram adicionados a 1 litro de F-medium. Ainda, foram adicionados 20 mL das amostras **MS122(R)** (crescimento em pequena escala) em 1 litro de meio sólido com arroz.

As culturas em crescimento em larga escala foram incubadas a 28<sup>0</sup>C com agitação (Shaker / MA420 com agitação) a 170 rpm por 10 dias.

### 3.7 Processo de extração de cepas marinhas

Após 10 dias incubados, as amostras **MS122**, **A-26**, **MF 156** e **MS122(R)**, obtidas a partir do crescimento de células em larga escala em seus respectivos meios de cultura e condições de crescimento, foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos.

O sobrenadante e as células foram separados através de um funil de separação à vácuo e as células foram armazenadas em freezer a -80<sup>0</sup>C.

Para o actinomiceto, amostra **MS122(R)**, após separação de sobrenadante e células à vácuo, a amostra foi embebida em metanol por 24

horas. Após este período a camada de metanol foi filtrada. Para extração dos compostos inicialmente, o sobrenadante (300 mL) foi extraído com acetato de etila (3 X 300 mL).

A seguir, detalhes procedimentais:

- a) A fase orgânica e aquosa foram separadas por um funil de separação e as frações orgânicas foram combinadas. O solvente da fração orgânica foi removido por evaporador rotatório (Fisatom 804) e as massas das frações orgânicas de cada amostra foram obtidas (Fração 1);
- b) A fração aquosa foi extraída com n- butanol (3X300 mL) separando a fase orgânica da fase aquosa. O solvente da fração orgânica foi removido através de evaporador rotatório obtendo-se as massas das amostras desejadas (Fração 2);
- c) A camada aquosa foi extraída novamente com n-butanol (3X300 mL) após ajuste de pH=1. Novamente foi separada a fase orgânica da fase aquosa. O solvente da fase orgânica foi totalmente removido por evaporador rotatório (Fisatom/ 804) (Fração 3);
- d) A fase aquosa da extração acima foi também removida por evaporador rotatório e assim obtidas as massas das amostras A-26, MS122, MF156, MS122(R). (Fração 4);

As células microbianas inicialmente armazenadas no freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$

foram embebidas em metanol e sonicadas para acelerar o processo de dissolução da amostra no solvente.

As misturas foram centrifugadas a 4000 rpm por 5 minutos para separação de células e sobrenadante. A camada de metanol foi submetida ao processo de evaporação para remoção de solvente. (Fração 5)

As células recuperadas foram embebidas em água destilada, incubadas a 4°C por 24 horas. Para separação da camada aquosa e célula foi utilizado o processo de centrifugação. As células viáveis foram salvas. (Fração 6).

A seguir detalhes procedimentais:

- a) A camada aquosa foi extraída com acetato de etila (3X15 mL). O solvente da fração orgânica foi removido por evaporador rotatório e as massas foram obtidas (Fração 7);
- b) A camada aquosa da extração acima foi extraída com n-butanol (3X15 mL). O solvente da camada orgânica foi removido por evaporador rotatório (Fração 8) e a camada aquosa foi novamente extraída com n-butanol (3X15 mL) com pH=1.
- c) Para remoção de solvente da camada orgânica e camada aquosa do processo de extração com n-butanol, foi utilizado evaporador rotatório e obtidas as massas das Frações 9 e Frações 10.

Os procedimentos acima de todo o processo de extração de cepas marinhas estão representados pelo diagrama da Figura 2 a seguir.

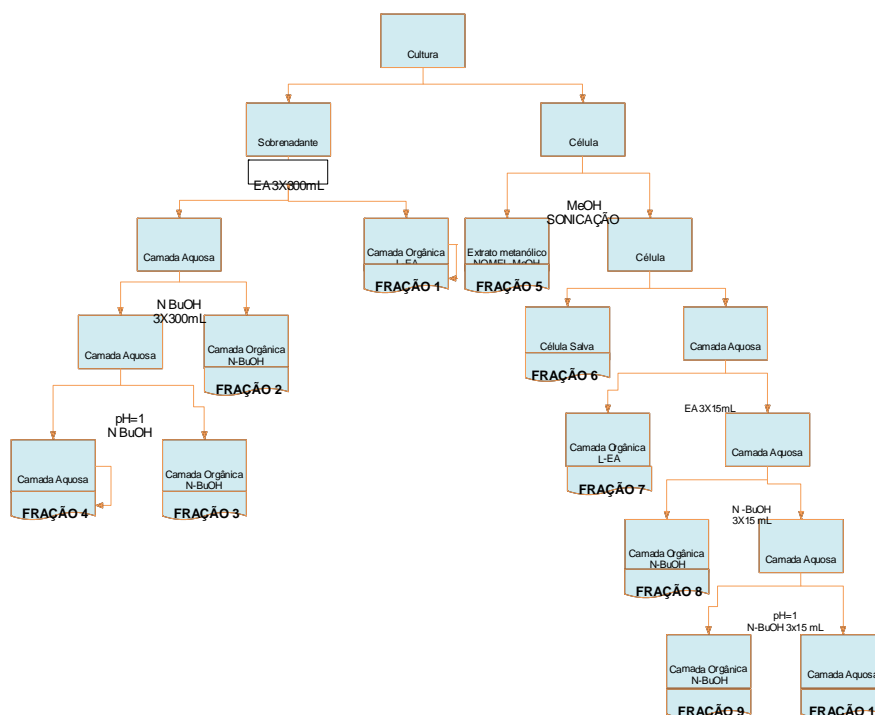


Figura 2 Processo de extração de compostos bioativos a partir de microrganismos à obtenção de frações.

Todas as frações obtidas foram armazenadas em freezer a 4<sup>0</sup> C para posteriores testes biológicos e análises químicas.

### 3.8 Cultura de células do câncer (MCF-7)

A cultura de células do câncer (MCF-7) foi efetuada mediante os seguintes procedimentos:



- a) Recuperação de células cancerosas
- b) Subcultura de células cancerosas
- c) Criopreservação de células cancerosas

### **3.8.1 Materiais e reagentes da cultura de células do câncer**

#### **3.8.1.1 Materiais**

- a) MCF-7: Morfologia: epitelial; linha celular de adenocarcinoma de glândula mamária humana [ATCC, Gato. No. HTB-22].
- b) Incubação da cultura de tecido: ar, 95%; dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), 5%; temperatura, 37°C;
- c) Placas com tampas: 6-Well CELLSTAR TC: Parte lisa, Esterilizada, BioExpress, Cat. No. T-3026-3;
- d) Placas: 96-Well Cell Culture: Corning Incorporated, Cat. No. 3595;
- e) FLx800 Fluorescence Microplate Reader: Bio-Tek;
- f) Cabine de Segurança Biológica; Placa para contagem de células; Pipetas (1000 µl, 200 µl, 20 µl); etc.

#### **3.8.1.2 Reagentes**

- a) Meio de crescimento completo ATCC: O meio de base para esta linha de células ATCC formulado é Meio Mínimo Essencial de

Eagle (E-MEM) Catálogo No. 30-2003. Para o meio de crescimento completo foram adicionados os seguintes componentes para o meio de base: 0,01 mg de insulina / mL de soro bovino; soro de bovino fetal a uma concentração final de 10% (ATCC recomendada);

- b) Meio FBS: Soro Fetal de Bovino, Qualified, US Origin, Gibco/Life Technologies, Catálogo No. 26140-079;
- c) 0,25% (w/v) Trypsin – 0,53 mM EDTA: 0.25% Trypsin/0.53 mM EDTA in Hanks Balanced Salt Solution sem cálcio ou magnésio; ATCC, Catálogo No. 30-2101;
- d) Meio PBS: Solução tampão de fosfato, SIGMA, Catálogo No. (P5368-10PAK), filtrado por esterilização com filtro de 0,22 µm depois dissolvido em água deionizada esterilizada.
- e) Meio congelado: Meio de crescimento completo suplementado com 5% (v/v) DMSO;
- f) Streptomicina-Penicilina: Life Technologies, Catálogo No. 15070-063, concentração de 100 U/ml Penicilina e 0.1 mg/ml Streptomycin;
- g) MTT: Brometo de Tiazolil Azul de Tetrazólio (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide), CAS Número 298-93-1, SIGMA, Catálogo No. M5655-500MG; 2.5 mg/ml a solução estoque MTT foi preparada por dissolução em 100 mM PBS (pH = 7.4), então filtrada através de membrana esterilizada 0.22 µm.
- h) DMSO: Dimetilsulfóxido, CAS Número 67-68-5, SIGMA,

Catálogo No. D8418-500 ML;

- i) Solução de azul de tripano (0,4%): CAS Número 72-57-1, SIGMA, Catálogo No. T8154-100 ML;

### **3.8.2 Procedimentos**

#### **3.8.2.1 Cultura de células**

- a) Recuperação de células cancerosas

Inicialmente retirou-se a cultura de células de câncer de um frasco estocado e congelado no tanque de nitrogênio líquido. A cultura foi descongelada rapidamente num banho de água a 37°C por aproximadamente 1 min.

Esterilizou-se a superfície do frasco com etanol 70% transferindo-o em seguida para uma cabine de segurança biológica.

As células microbianas foram então transferidas para 6.0 ~ 8.0 mL de meio de cultura completo (EMEM) pré-aquecido a 37°C para lavagem das células e em seguida centrifugou-se o meio de cultura contendo células (1000 rpm por 5 min à 4 °C). Após esse procedimento descartou-se o sobrenadante.

Adicionaram-se 2 mL de meio de cultura completo de células para ressuspender as células cancerosas e transferiu-se 1 mL da mistura de células de cada poço para placas contendo 6 poços. Adicionou-se novamente mais 1 mL de meio de cultura completo para cada poço contendo cultura de células.

A placa contendo cultura e meio foi incubada a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. O meio EMEM da placa foi renovado 2 a 3 vezes por semana, a cada 48h. (Considerando-se que a cultura MCF-7 dobra depois de 29 horas).

As culturas foram mantidas a uma concentração de células entre  $2 \times 10^4$  e  $2 \times 10^6$  cel/cm<sup>2</sup>.

### **3.8.3 Subcultura de células cancerosas**

Quando as células do câncer recobriram 80% a 90% da superfície da placa, descartou-se, com o uso de uma pipeta automática, o meio de cultura, da placa incubada. Em seguida, adicionou-se tampão (meio de cultura PBS), para lavar e remover o meio residual na cultura de células cancerosas bem aderentes, suave e ligeiramente e, em seguida, eliminou-se o PBS. Adicionou-se posteriormente 600 µl~800 µl (concentração dependente da quantidade de células MCF-7).

Na maioria dos testes, a concentração de células cobriu toda a cavidade, portanto adicionou-se 800 µl de solução de Trypsin 0.25% (w/v) - 0.53 Mm EDTA em cada poço da placa contendo cultura de células cancerosas. A placa foi incubada a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> por 3a 5 minutos e, após este período, as células foram observadas através de microscópio (a fim de se evitar aglutinação).

Adicionou-se 1 mL de meio de cultura completo (EMEM) em cada poço da placa, de modo que as células cancerosas se desprendessem do fundo da placa e formassem suspensão de células simples, e coletou-se a suspensão de células

em um tubo estéril. A esta suspensão de células, adicionou-se 4 mL de meio de cultura completo (EMEM) (aproximadamente 1.6 a 0,25% (M/V) Trypsin – solução de EDTA 0,53Mm e 7,2 ml meio), e centrifugou-se a 1000 rpm por 5 min, e então descartou-se o sobrenadante.

As células foram ressuspensas em meio de cultura completo (EMEM), para realização da contagem de células inoculadas, ( $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$  cel/  $\text{cm}^2$ ) à nova placa e estas foram incubadas 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

#### **3.8.4 Criopreservação de células cancerosas**

Inicialmente para a etapa de criopreservação, descartou-se o meio de cultura da placa contendo 6 poços e adicionou-se o tampão PBS para lavar a superfície das células cancerosas, suave e ligeiramente e, em seguida, eliminou-se o PBS.

Adicionou-se em seguida 600 µl~800 µl a cada cavidade dos 6 poços da placa, para digestão das células cancerosas, e em seguida foram incubados a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> por aproximadamente 3 ~ 5min.

Após curto período de incubação, adicionou-se 1 mL de meio de cultura (EMEM) em cada poço da placa. Em seguida coletou-se a suspensão de células em um tubo estéril e adicionou-se 4 mL de meio de cultura completo (EMEM). Centrifugou-se a 1000 rpm por 5 min, e então descartou-se o sobrenadante.

As células cancerígenas foram ressuspensas com meio crioprotetor, realizando-se a contagem de células em câmara de Neubauer e a densidade

celular foi regulada em  $1 \times 10^6$  células/mL. As células foram armazenadas em tubos especiais congelados, aproximadamente 1 ~ 1,5 mL em cada tubo.

Rotulou-se o nome da célula nas superfícies dos tubos congelados, o tempo de congelamento e o operador. Colocou-se os tubos congelados dentro de uma caixa de arrefecimento programado e colocou-se em pelo menos um dia a  $80^{\circ}\text{C}$  e, em seguida, transferiu os tubos para os tanques de nitrogênio líquido.

### **3.9 Testes “Drug Screening” com frações de cepas marinhas**

Para realização dos testes, inoculou-se  $2 \times 10^4$  células / 100  $\mu\text{L}$  de cultura de células de cada poço nas placas de 6 poços de cultura de tecidos e incubou-se a placa por 24 horas, a  $37^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{CO}_2$  a 5% para permitir o crescimento de células aderentes bem antes do tratamento com as amostras.

Todas as amostras testadas (Frações 1 a 10 das amostras A-26, MS122, MF156 e MS122 (R)) foram diluídas a uma concentração de 10 mg/mL com DMSO e adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  da solução (200  $\mu\text{g}$  / mL meio de cultura completo) em 100  $\mu\text{L}$  cultura de células cancerosas, totalizando um volume de 200  $\mu\text{L}$ , sendo a concentração final de drogas 100  $\mu\text{g}$  / mL, (a mais elevada), contendo 1% DMSO.

O grupo controle foi definido adicionando 100  $\mu\text{L}$  de meio de cultura completo com 2% DMSO em 100  $\mu\text{L}$  de cultura de célula de câncer, obtendo uma concentração final de 1% DMSO, similar ao procedimento acima.

Todos os resultados foram submetidos à análises estatísticas sendo

analisadas as repetições e as formas de tratamento descritos no item 2.12.

Taxa inibitória (%) de crescimento do tumor = [(absorbância médio de da amostra) / absorbância média do controle] \*100%

### **3.10 Ensaio MTT (Meio de cultura Brometo de Tiazolil Azul de Tetrazólio)**

O ensaio MTT consiste no uso de sais de tetrazólio, Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 - difeniltetrazólio). Neste ensaio de proliferação celular, quantifica-se a habilidade das células viáveis reduzirem o sal amarelo de tetrazolium a cristais púrpuros de formazan, usando uma enzima mitocondrial, a succinato desidrogenase detectando células metabolicamente ativas sendo a leitura feita em espectrofotômetro. A absorbância é determinada a 540 ou 570 nm em leitor de ELISA.

#### **3.10.1 Determinação do número apropriado de inoculação de células do câncer para o ensaio de MTT**

O meio de cultura EMEM foi removido e rapidamente lavou-se a camada de células (filtro estéril de 0,22 µm) com tampão PBS para remoção de todos os vestígios de ser um, que contém inibidor de tripsina.

Em seguida, adicionou-se 800 µl de solução Tripsina-EDTA em cada um dos seis poços da placa, incubou-se a placa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> para facilitar que as células se destacassem e observou-se as células através de microscópio durante 2 a 5 minutos.

Tabela 1 Números de células e volume da cultura de MCF-7 antes do tratamento com MTT

Grupo 1: Quantidade de células	Grupo 1: Volume/Cultura ( $\mu\text{L}$ )	Grupo 2: Quantidade de células	Grupo 2: Volume/Cultura ( $\mu\text{L}$ )
60000	200	15000	100
30000	200	7500	100
15000	200	3750	100
7500	200	1875	100
3750	200	937.5	100
1875	200	468.75	100
937.5	200	234.375	100
468.75	200	117.1875	100
234.375	200	58.59375	100

Nota: 3 repetições para cada célula diferente

Após observação em microscópio, foi adicionado na placa 3~4 mL de meio de cultura completo puxando lentamente as células (utilizando a pipeta automática). Transferiu-se a suspensão de células para um tubo que foi centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos sendo o sobrenadante descartado.

Os sedimentos celulares foram ressuspensos em meio de crescimento fresco e semeadas em poços de microtitulação. As alíquotas apropriadas da suspensão de células foram adicionadas em 96 poços de placa contendo cultura de células antes de tratamento MTT (Tabela 2).

As culturas foram incubadas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> por 72 horas e após período de incubação, adicionou-se 20  $\mu\text{L}$  de MTT 2,5 mg/mL em 200  $\mu\text{L}$  de cultura de célula e 10  $\mu\text{L}$  de MTT 2,5 mg/ml em 100  $\mu\text{L}$  de cultura de célula, sendo a concentração de MTT de 0.25 mg/mL. A placa foi incubada por 4 horas a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> para clivar o corante MTT e formar cristais de púrpura sob a catálise de desidrogenases mitocondriais em células vivas.



Após remoção total do meio de cultura por pipetagem suave, adicionou-se 100 µL de DMSO para dissolver os cristais insolúveis de púrpura em uma solução colorida, agitando em seguida por cerca de 3 minutos. A absorbância desta solução de cor foi quantificada medindo a absorbância em um determinado comprimento de onda (570 nm) por um espectrofotômetro - FLx800 Fluorescence Microplate Reader.

### **3.11 Contagem de células**

A cultura de células cancerosas, com amostras testadas em placa 96 furos, foram incubadas por cerca de 43 horas. Desta maneira o tempo total de experimento é de (24 horas células/branco + 43 horas tratamento amostras + 4 horas tratamento MTT).

Após o período de incubação, removeu-se 200 µL do sobrenadante de cada poço da placa (96 furos) e adicionou-se em seguida 100 µL de PBS para lavar o poço.

Adicionou-se 50 µl de Tripsina 0,25% (M/V)-0.53 mM EDTA, em seguida incubou-se a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, por 2min. Após este tempo adicionou-se 100 µL de meio de cultura completo (EMEM) para parar a reação e 50 µL de solução azul de Trypan (0.4%), incubando a placa novamente por 1min.

Para o cálculo do número de células foi utilizado corante Blood Cell e a contagem foi realizada na câmara de Neubauer.

### 3.12 Procedimentos de análise dos dados

Os experimentos foram realizados utilizando 4 tipos de amostras, identificadas neste trabalho como A26, MS122, MS122(R) e M156. Para cada tipo de droga foram utilizadas 10 frações distintas, e para cada tipo de fração foram feitos testes com a droga em alta concentração (100 µg/mL, 1% DMSO e controle de grupo a 0,7314) e baixa concentração (10 µg/mL, 1% DMSO e controle de grupo a 0,7314).

Ao todo, foram obtidos dados referentes a 72 leituras. Os dados provenientes da alta e baixa concentração foram utilizados para cálculo individual juntamente com o fator de controle do grupo. A fórmula utilizada para análise dos dados foi a seguinte:

$$\text{Taxa de inibição/estímulo do crescimento do tumor (\%)} = \left[ \frac{\text{média de absorção da amostra de absorbância de controle}}{\text{média de absorbância de controle}} \right] * 100\%$$

Os resultados referentes aos valores de inibição/estímulo de crescimento do tumor (%) foram submetidos à análise de variância visando determinar os intervalos de confiança dos resultados.

De posse dos resultados da aplicação da fórmula, procedeu-se a classificação para encontrar a droga, fração e dosagem (alta ou baixa) que resultaram em inibição e/ou proliferação das células cancerígenas estudadas. Além desta classificação também procedeu-se com a criação do gráfico plot no

SPSS e gráficos de barra no Excel para analisar visualmente as combinações com maior potencial diante dos objetivos da pesquisa.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Resultados do preparo de cepas marinhas

Do material inicial coletado foram isoladas e purificadas linhagens de fungos e actinomicetos a partir dos meios de cultura BDA e Gauze. Estes meios de cultura favoreceram o crescimento e isolamento das linhagens. Durante o processo de crescimento dos microrganismos em placas de petri na estufa, a temperatura de 28<sup>o</sup>C favoreceu o crescimento das colônias, como pode ser observado nas figuras 2, 3 e 4.

As metodologias de diluição e esfregaço não apresentaram muito eficiência dificultando o trabalho inicial de isolamento. O processo de esfregaço dos extratos aquosos (sem diluição e diluição 10<sup>2</sup>) fez com que as colônias crescessem dispersas (Figura 3)

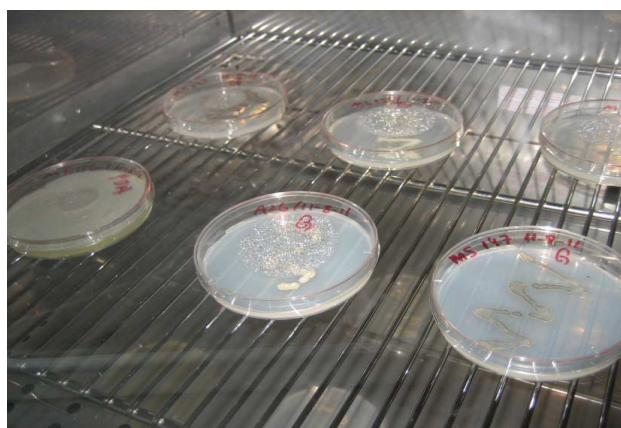


Figura 3 Crescimento de colônias de actinomicetos e fungos MF156 em meios Gauze e BDA respectivamente



Figura 4 Isolado A-26 em meio Gauze



Figura 5 Isolado MS122 meio de cultura Gauze

Dentre as linhagens isoladas, aquelas que originaram extratos brutos ou frações com resultados positivos nos ensaios de atividade biológica foram armazenadas para posterior identificação taxonômica das espécies.

#### 4.2 Fermentação em meio líquido em pequena escala

Nesta etapa de crescimento de células em meio líquido LB (Broth Miller 1,25g/ 50 mL), após agitação constante a 28<sup>0</sup>C por 2 dias, como mostrado na Figura 6, pôde-se perceber a diferença de cor e viscosidade dos meios de cultura tornando estes mais escuros e densos, devido a um aumento significativo de células e produção de metabólitos secundários.



Figura 6 Crescimento de células MS122 e A-26 em pequena escala

#### 4.3 Fermentação em meio líquido em larga escala

A técnica de crescimento de células em larga escala foi realizada com sucesso após 10 dias de incubação a 28<sup>0</sup>C sob agitação constante. Como pode-se observar na Figura 7, ocorreu uma mudança na consistência e tonalidade dos meios de cultura líquidos, sob agitação, e também presença de manchas marrons

no meio sólido indicando portanto o desenvolvimento de células concentradas de actinomicetos.



Figura 7 Crescimento de células MS122 e A-26 em larga escala, meios de cultura: M004 medium e F-medium

#### 4.4 Processo de extração de cepas marinhas

Após o período de fermentação, os meios foram filtrados. Primeiramente a biomassa foi separada do meio de cultura por filtração a vácuo, utilizando-se um funil sinterizado acoplado a um kitassato. Como filtro utilizou-se papel de filtro recoberto com uma camada de celite. A biomassa foi então imersa em 100 mL de MeOH, extraído durante um minuto em um banho de ultrassom e filtrado, dando origem ao extrato metanólico do micélio, como ilustrado na Figura 8.



Figura 8 Células/micélio da amostra A-26 após processo de filtração

Após etapa de filtração para separação do sobrenadante e células, o filtrado obtido foi centrifugado e a partir do filtrado livre de células iniciou-se o processo de extração com solventes orgânicos de polaridades diversas. Esta metodologia consiste na separação das fases aquosas e orgânicas e os solventes escolhidos para esta etapa foram acetato de etila, butanol e metanol. A escolha dos solventes envolveu um compromisso entre maximizar a eficiência da reação e garantir o maior número de metabólitos.

Os solventes acetato de etila, butanol e metanol foram selecionados baseados pela miscibilidade do solvente. Solventes quimicamente semelhantes que possuem parâmetros de seletividade similares fazem parte do mesmo grupo, embora possam apresentar diferentes valores de polaridade. Os metabólitos extraídos a partir destes solventes podem representar muitas classes de diferentes compostos incluindo aminoácidos, gorduras e ácidos orgânicos sendo que as



condições de extração diferem muito para os diferentes tipos de compostos.

#### 4.5 Frações obtidas a partir dos processos de extração de cepas marinhas

De acordo com o processo de extração de metabólitos de actinomicetos e fungos marinhos descritos no item 2.7, foram obtidas as seguintes frações de acordo com os diagramas abaixo.

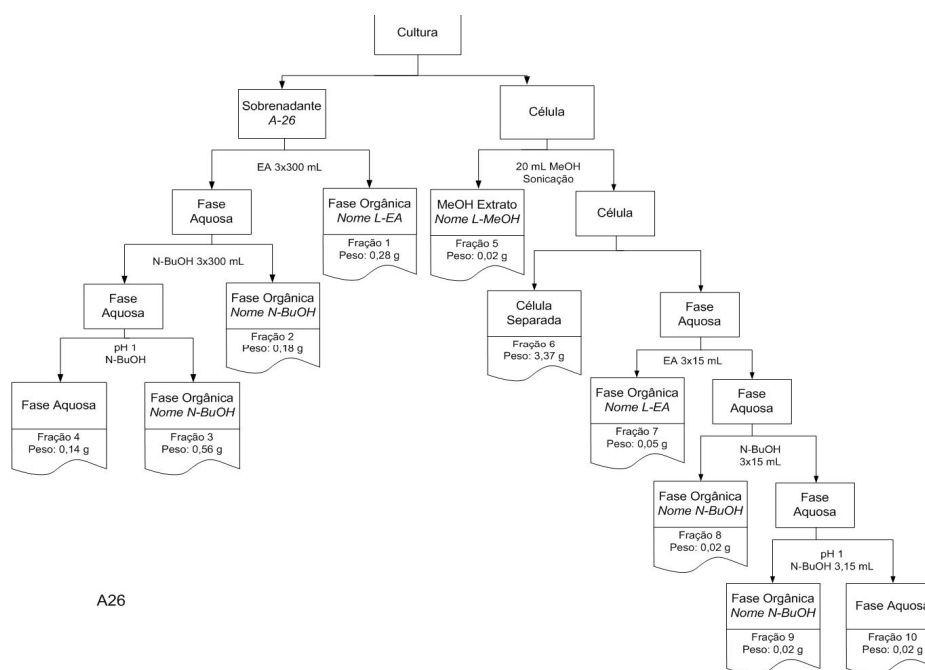


Figura 9 Processo de extração de compostos bioativos a partir da amostra A-26 à obtenção de frações e suas respectivas massas.

Como pode-se observar nos diagramas apresentados, a partir da cultura de células iniciou-se todo o processo de extração com a separação do

sobrenadante e células. A fase orgânica foi separada da fase aquosa pelos diferentes solventes (acetato de etila, metanol e butanol). As massas das frações variaram de acordo com as condições da separação e solventes.

Em contrapartida, as frações orgânicas extraídas com o solvente acetato de etila apresentaram um rendimento baixo, apresentando somente massa suficiente para ser enviada aos ensaios de atividade biológica utilizados nesta investigação. O solvente escolhido deve ser o mais seletivo possível.

O processo inicial de extração com o solvente acetato de etila foi repetido de acordo com a demanda de massa para resultados dos testes biológicos e posterior etapa de purificação.

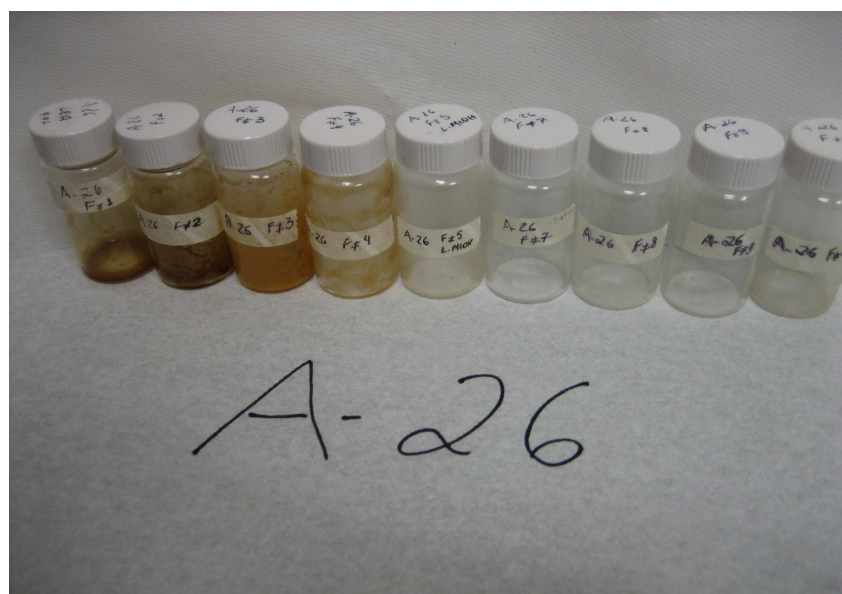


Figura 10 Frações da amostra A-26 obtidas após etapa de extração com diferentes solventes (acetato de etila, metanol, butanol)

No final de cada processo de extração, as frações foram submetidas ao processo de evaporação a vácuo e as massas finais foram obtidas.

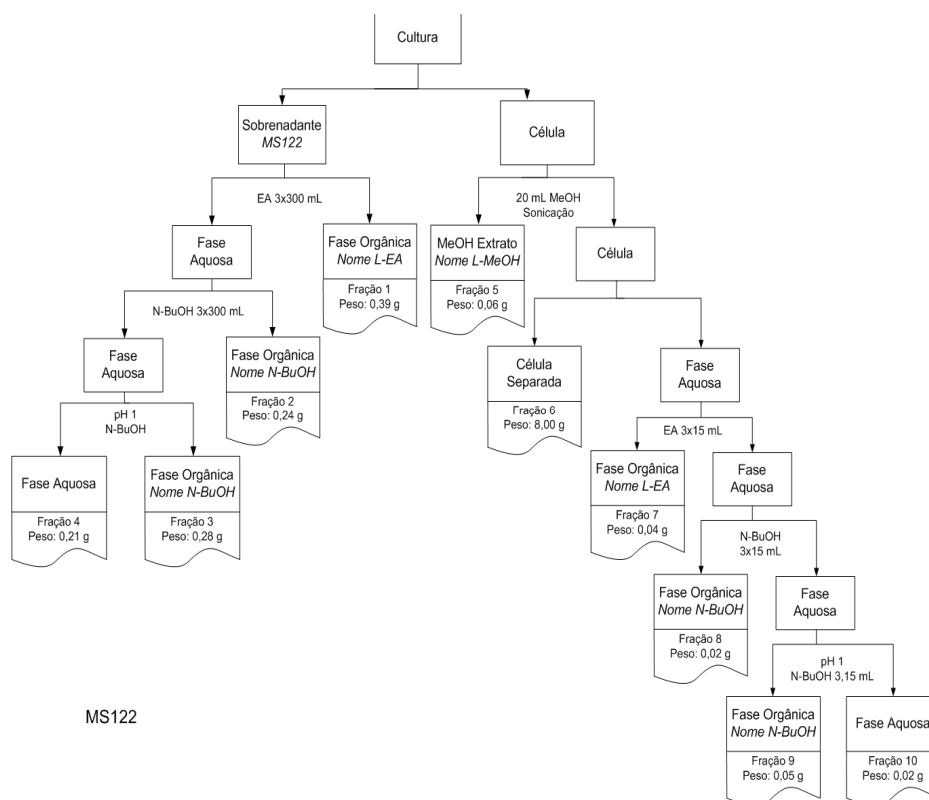
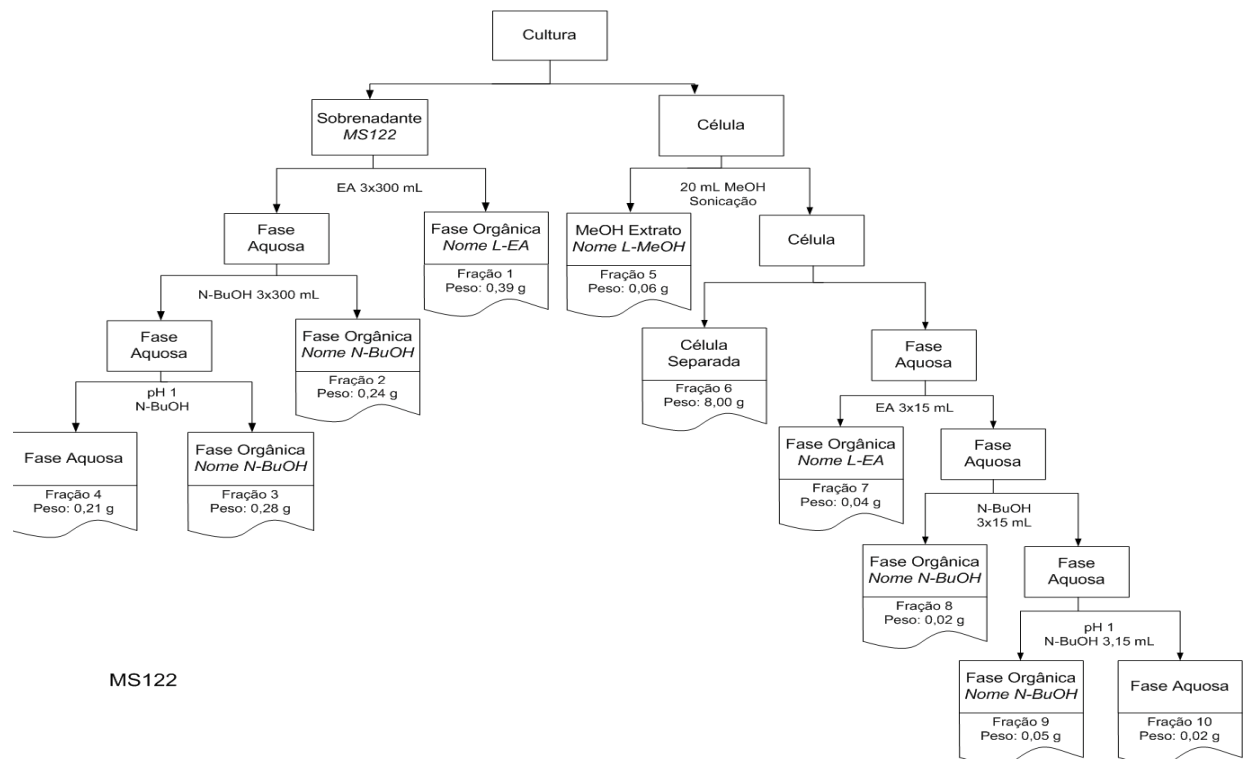


Figura 11 Processo de extração de compostos bioativos a partir da amostra MS122 à obtenção de frações e suas respectivas massas.



Figura 12 Frações da amostra MS122 obtidas após etapa de extração com diferentes solventes (acetato de etila, metanol, butanol)

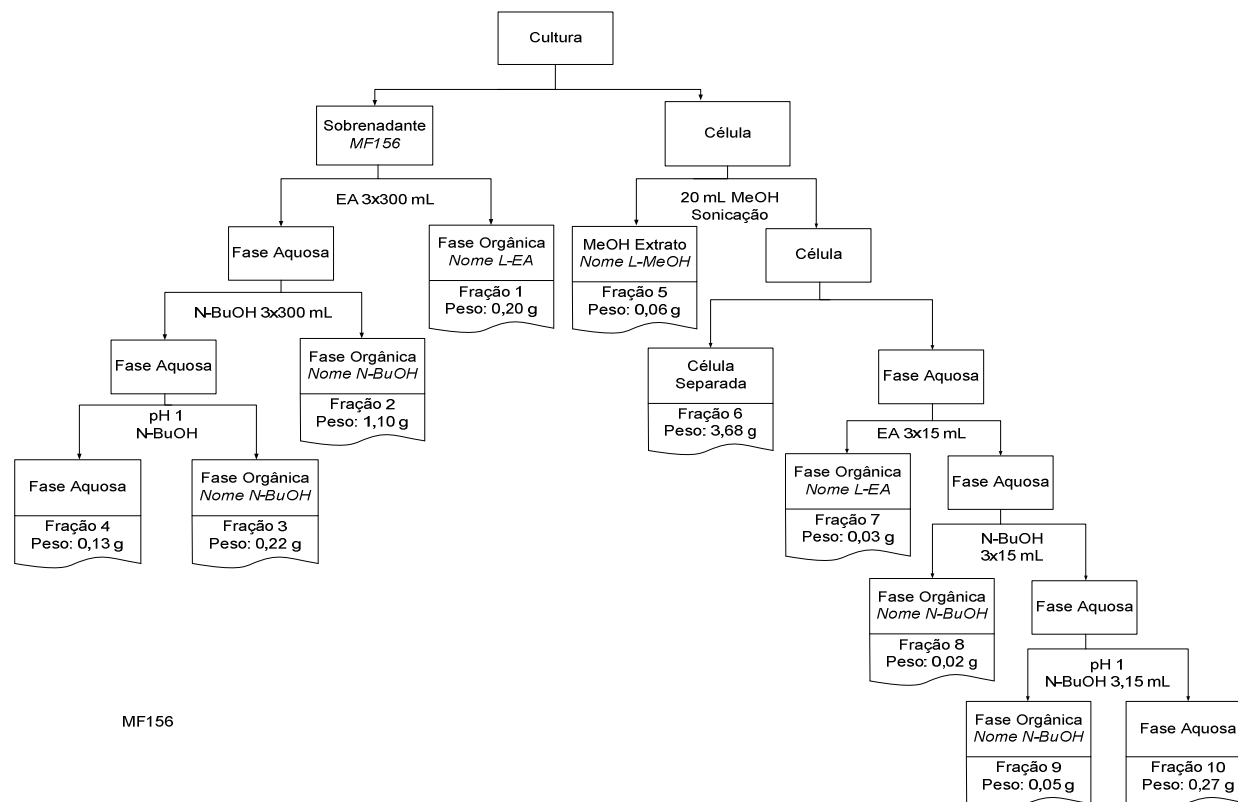


MS122

Figura 13 Processo de extração de compostos bioativos a partir da amostra MS122 (R) à obtenção de frações e suas respectivas massas.



Figura 14 Frações da amostra MS122 (R) obtidas após etapa de extração com diferentes solventes (acetato de etila, metanol, butanol)



MF156

Figura 15 Processo de extração de compostos bioativos a partir da amostra MF156 à obtenção de frações e suas respectivas massas.



Figura 16 Frações MF156 obtidas após etapa de extração com diferentes solventes (acetato de etila, metanol, butanol)

### 3.6 Efeitos das frações de estirpes marinhas sobre o crescimento de células cancerosas MCF-7

As curvas de crescimento das linhagens MCF-7 foram realizadas, de acordo com as figuras 16 e 17, para se determinar quantidade ideal de células a serem plaqueadas no experimento. A faixa escolhida foi de aproximadamente  $2 \times 10^4$  células em cada poço da placa e o valor de absorbância foi em 570 nm durante o aumento exponencial da região após 72 horas. Esta cultura de células foi utilizada para realização dos testes de drug screening, de acordo com os métodos 3.13. A tabela 3 apresenta os dados da curva de crescimento da Figura 16.



Tabela 2 Análise de dados para curva de crescimento de células MCF-7 em 200  $\mu$ l de cultura de células

Quantidade de células	Média OD570	SD
60000	0,5439	0,0159
30000	0,5775	0,0299
15000	0,4091	0,0675
7500	0,2286	0,0217
3750	0,1458	0,0165
1875	0,0730	0,0098
937.5	0,0381	0,0009
468.75	0,0101	0,0054
234.375	0,0316	0,0045

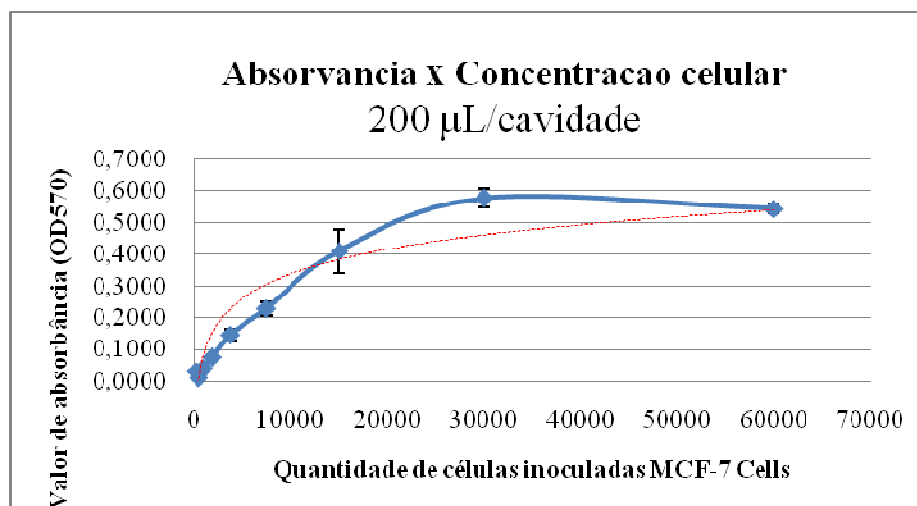


Figura 17 Comportamento da absorvância de diferentes concentrações de células MCF-7 em 200  $\mu$ l de cultura de células

Como pode-se observar, tem-se a curva de crescimento de células MCF-7, em 200  $\mu$ l de cultura de células, (Figura 18). Esta curva se forma a partir da quantidade de células versus o valor de absorvância. Em 200  $\mu$ L de cultura de células por cada cavidade da placa, ocorreu um crescimento de células, sendo

que após o valor de absorvância na ordem de 0,6 se comparado com curva padrão, o crescimento das células MCF-7 se estabilizou.

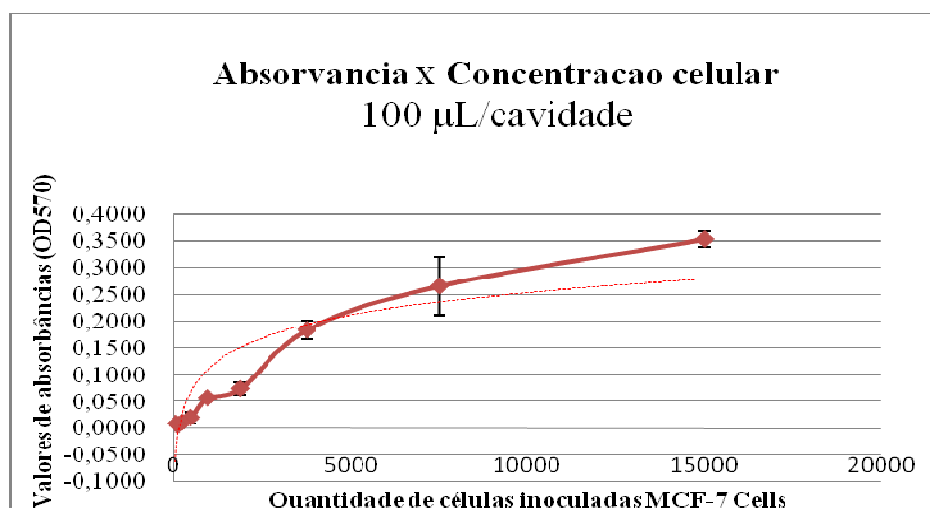


Figura 18 Comportamento da absorvância de diferentes concentrações de células MCF-7 em 100 µl de cultura de células

Tabela 3 Análise de dados da curva de crescimento de células MCF-7 em 100 µl de cultura de células

Quantidade de células	Média OD570	SD
15000	0,3535	0,0141
7500	0,2663	0,0539
3750	0,1840	0,0173
1875	0,0740	0,0114
937.5	0,0565	0,0040
468.75	0,0194	0,0106
234.375	0,0106	0,0002
117.1875	0,0050	0,0033
58.59375	0,0085	0,0018

Para a leitura da curva de crescimento de células MCF-7, em 100 µl de cultura de células por cada cavidade da placa, de acordo com a figura 17, valores

de absorvância foram mais baixos variando de acordo com a quantidade de células inoculadas. A Tabela 4 apresenta os dados da curva de crescimento da Figura 19.

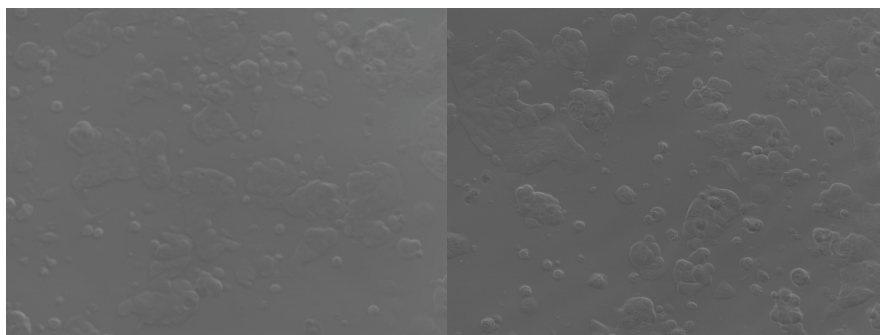


Figura 19 Status de crescimento de células MCF-7

Todas as células foram aderentes após 24 horas de cultivo como observado na Figura 18, sendo a imagem da esquerda: crescimento em 200  $\mu$ L de meio; imagem da direita: crescimento em 100  $\mu$ L de meio (os dois foram aderentes).

### **3.7 Resultados dos testes *Drug Screening* dos metabólitos marinhos microbianos**

O tratamento das frações ocorreu de acordo com o procedimento de 2.9, sendo cada amostra testada com três repetições.

Após repetições dos testes em células MCF-7 com os 36 extratos selecionados, numerados na tabela a seguir, foram gerados os gráficos representados na figura 19. Todos os resultados foram obtidos a partir dos testes

em células MCF-7 com os 36 extratos selecionados submetidos à análises estatísticas descritivas sendo analisadas as repetições e as formas de tratamento.

Os valores acima de zero representam inibição de crescimento, enquanto que os valores negativos representam estímulo de crescimento.

Tabela 4 Número e nome das amostras/ metabólitos microbianos marinhos

<b>Número</b>	<b>Código da Amostra</b>	<b>Número</b>	<b>Código da Amostra</b>
1	A26 F1	19	MS122(R) F1
2	A26 F2	20	MS122(R) F2
3	A26 F3	21	MS122(R) F3
4	A26 F4	22	MS122(R) F4
5	A26 F5	23	MS122(R) F5
6	A26 F7	24	MS122(R) F7
7	A26 F8	25	MS122(R) F8
8	A26 F9	26	MS122(R) F9
9	A26 F10	27	MS122(R) F10
10	MS122 F1	28	M156 F1
11	MS122 F2	29	M156 F2
12	MS122 F3	30	M156 F3
13	MS122 F4	31	M156 F4
14	MS122 F5	32	M156 F5
15	MS122 F7	33	M156 F7
16	MS122 F8	34	M156 F8
17	MS122 F9	35	M156 F9
18	MS122 F10	36	M156 F10

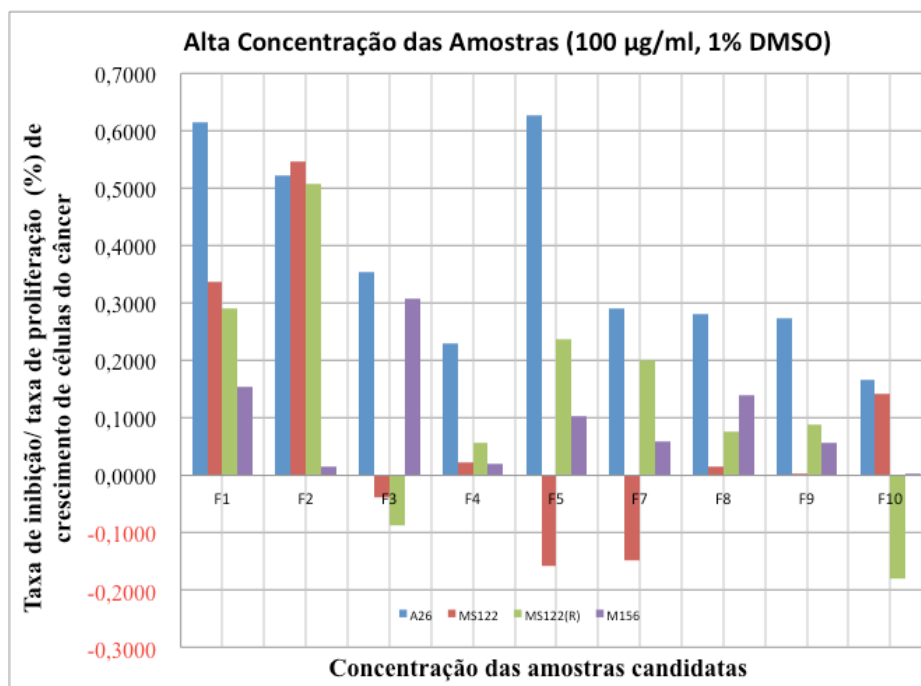


Figura 20 Atividade bioativa sobre células de câncer (MCF7) por metabólitos marinhos microbianos

De acordo com os resultados dos testes “drug screening” em células MCF-7, realizados com as 36 amostras obtidas a partir de cepas marinhas, figura 20, pode-se perceber que as frações F1 (fase orgânica/acetato de etila); F2 (fase orgânica/n-butanol) e F5 (fração metanólica) da amostra A-26 (*Streptomyces sp.*) apresentaram uma maior taxa de inibição de células MCF-7 quando comparadas com outras amostras. MF156 F(1-10) referentes ao isolado fúngico não apresentaram resultados significativos quando comparados com frações obtidas de actinomicetos, amostras de MS122 (R) F(1-10) e A-26 (1-10).

As frações de MS122 F(1-10) obtidas a partir de linhagens de

actinomicetos inibiram e estimularam o crescimento de células MCF-7. A taxa de inibição e estimulação variou bastante de acordo com as altas e baixas concentrações de drogas, destacando MS122 (R) F-3 que apresentou um potencial para estimular desenvolvimento de células cancerosas em baixas concentrações. Esta fração butanólica foi submetida a novos testes para confirmação de resultados.

A taxa de inibição da cultura de células MCF-7 das frações obtidas a partir de A-26, linhagem actinomicetos, apresentaram em altas concentrações e em baixas concentrações de frações resultados significativos podendo estes compostos ser considerados como potenciais produtores de metabólitos secundários microbianos. A fração metanólica A26-F5 e acetato de etila A26-F1, apresentaram as maiores taxas de inibição de células cancerosas. Estas frações foram novamente submetidas a testes com células MCF-7 para confirmação de resultados indicando a síntese de compostos bioativos e potencial biológico destes.

De acordo com os testes realizados, pode-se ainda avaliar os resultados obtidos com as frações de MS122 (R). Todas as frações butanólicas e de acetato de etila extraídas a partir de *Streptomyces sp.* marinhos apresentaram capacidade de estimular o crescimento de células MCF-7 em baixas concentrações das drogas. Os metabólitos secundários das frações de *Streptomyces sp.* MS122(R)F-3 e MS122(R) F-5 apresentaram resultados significativos sendo estas frações testadas novamente para confirmação de resultados.

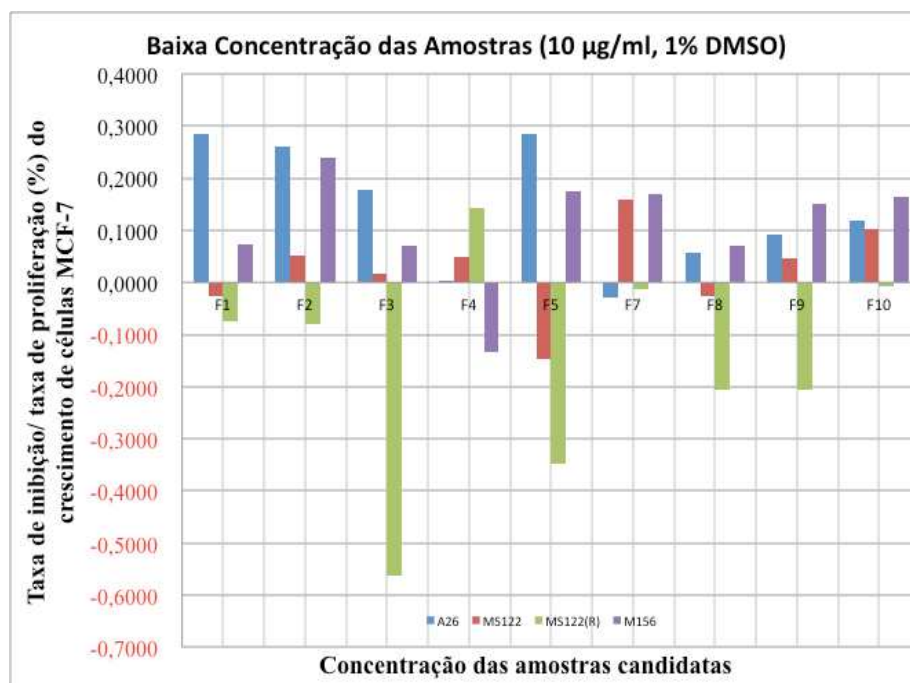


Figura 21 Atividade bioativa sobre células de câncer (MCF7) por metabólitos marinhos microbianos

De acordo com a figura 20, os metabólitos obtidos a partir de microrganismos marinhos, actinomicetos, apresentaram as taxas de estímulo e/ou proliferação sobre células MCF-7. A proliferação de células MCF-7 apresentou efeito significativo devido à capacidade de extração de metabólitos das frações butanólica e metanólica obtidas a partir de *Streptomyces*. Esses microrganismos possuem capacidade de se multiplicar, produzindo biomassa considerável, além de metabólitos secundários com alto poder toxicológico.

Amostras em vermelho (inibição) e azul (estímulo) foram selecionadas para repetição dos testes drug screening, conforme tabela 6.

Tabela 5 Inibição e/ou estimulação das frações sobre a proliferação de células do câncer de mama MCF-7

Número	Código amostra	Número	Código amostra
1	A26 F1	14	MS122 F5
2	A26 F2	15	MS122 F7
3	A26 F3	21	MS122(R) F3
5	A26 F5	23	MS122(R) F5
11	MS122 F2	25	MS122(R) F8
20	MS122(R) F2	26	MS122(R) F9
30	M156 F3	27	MS122(R) F10

Foram realizadas várias repetições de testes em células MCF-7 para comprovação de resultados com as amostras da tabela 6.0. Os resultados podem ser observados de acordo com o gráfico seguinte.

A partir dos resultados apresentados dos testes de inibição e estímulo da proliferação das células MCF-7 com as frações extraídas a partir de microrganismos marinhos, pôde-se confirmar a capacidade de inibição das células do câncer pela amostra A26, destacando-se as frações A26 F-1 e A26 F-5 obtidas de linhagens de *Streptomyces* sp.

De acordo com relatos da literatura, o fracionamento de metabólitos de *Streptomyces* sp tem sido objeto de pesquisas em células MCF-7. No trabalho de Wai Kien Yip et al., 2010, avaliou-se o potencial biológico de três frações isoladas a partir de estirpes de *Streptomyces* sp. (H7372). Uma das frações, designadas como 31-2, exibiu mais fortemente o efeito inibidor do crescimento e, assim, foi escolhida para estudos posteriores. Esta fração exerceu um efeito inibidor do crescimento em um painel de 15 amostras de cancro humano e duas linhas de células não-malignas. Nas células MCF- 7 e MDA -MB 231 células de



cancro da mama, 31-2 induziu um efeito citostático (antiproliferativa), sem provocar citotoxicidade (morte celular).

Kim e Goodfellow (2009) caracterizaram as funções biológicas de protocatechuic aldehyde (PA), isolado a partir do extrato butanólico do sobrenadante da cultura de *Streptomyces lincolnensis* M-20. Após a extração com butanol, o extrato foi purificado por cromatografia em gel de sílica e uma coluna de Sephadex LH-20. PA foi analisado por espectroscopia de infravermelho com transformada Fourier (FT-IR), cromatografia gasosa - espectrometria de massas (GC-MS) e ressonância magnética nuclear (RMN). PA teve potente atividade antioxidante e atividade antitumor contra células MCF-7 do cancro da mama humano também avaliado pelo método MTT.

Estima-se que o gênero *Streptomyces* possa produzir pelo menos um milhão de novos compostos de interesse biológico(WATVE et al., 2001). De acordo com dados na literatura, a triagem, isolamento e caracterização de cepas promissoras de actinomicetos produtores potenciais de antibióticos têm sido uma importante área de pesquisa de muitos grupos por muitos anos (HACENE et al., 1999).

Uma ampla variação nas percentagens de isolados ativos e espectros de atividade resultam da grande diversidade metabólica destes isolados e a metodologia utilizada para a atividade de triagem.

### 3.8 Resultados dos Testes Drug Screening

Tabela 6 Resumo dos resultados dos testes Drug Screening

Amostra	Alta Concentração de amostra (100 µg/ml, 1% DMSO)						Baixa Concentração da amostra (10 µg/ml, 1% DMSO)						Repetições (N)
	Taxa de inibição (IR) (%) do crescimento do tumor			Média	SD	SEM	Taxa de inibição (%) do crescimento do tumor			Média	SD	SEM	
A26 F1	0.6156	0.6448	0.6450	0.6351	0.0169	0.0098	0.2835	0.2330	0.2660	0.2608	0.0257	0.0148	3
A26 F2	0.5216	0.3974		0.4595	0.0879	0.0621	0.2595	-0.0117		0.1239	0.1918	0.1356	2
A26 F3	0.3547	-0.0403	-0.0543	0.0867	0.2322	0.1341	0.1781	-0.0609	-0.2735	-0.0521	0.2259	0.1304	3
A26 F5	0.6266	0.6356	0.5876	0.6166	0.0255	0.0147	0.2855	0.2291	0.2609	0.2585	0.0283	0.0163	3
MS122 F2	0.5469	0.4876		0.5172	0.0419	0.0296	0.0510	0.0448		0.0479	0.0044	0.0031	2
MS122 F5	-0.1582	-0.1611		-0.1597	0.0020	0.0014	-0.1474	-0.1741		-0.1608	0.0189	0.0134	2
MS122 F7	-0.1473	-0.3741	-0.6338	-0.3851	0.2434	0.1405	0.1575	-0.2149	-0.3727	-0.1434	0.2723	0.1572	3
MS122(R) F2	0.5073	0.5534		0.5303	0.0326	0.0230	-0.0788	-0.1259		-0.1024	0.0333	0.0236	2
MS122(R) F3	-0.0866	-0.1374	-0.2318	-0.1519	0.0737	0.0425	-0.5619	-0.3578	-0.3085	-0.4094	0.1343	0.0776	3
MS122(R) F5	0.2376	-0.0130		0.1123	0.1772	0.1253	-0.3475	-0.0375		-0.1925	0.2192	0.1550	2
MS122(R) F8	0.0772	-0.3857	-0.3907	-0.2330	0.2687	0.1551	-0.2061	-0.1082	-0.1261	-0.1468	0.0521	0.0301	3
MS122(R) F9	0.0886	-0.4269	-0.5467	-0.2950	0.3376	0.1949	-0.2063	-0.3691	-0.3573	-0.3109	0.0908	0.0524	3
Drug Sample Name	Taxa de inibição (IR) (%) Crescimento do tumor			Média	SD	SEM	Taxa de inibição (%) crescimento do tumor			IR	SD	SEM	
MS122(R) F10	-0.1791	-0.3426	-0.2105	-0.2441	0.0868	0.0501	-0.0082	-0.1487	-0.1978	-0.1182	0.0984	0.0568	3
MI56 F3	0.3071	-0.1611	0.0831	0.0764	0.2341	0.1352	0.0698	-0.1741	-0.2512	-0.1185	0.1676	0.0967	3

A Tabela 3 acima representa os resultados gerais dos testes em células MCF-7, com as amostras numeradas, obtidas a partir de microrganismos marinhos. Para cada amostra foram realizadas repetições e os testes foram realizados em baixas concentrações e altas concentrações de drogas. Para análises estatísticas foram geradas as médias e desvio padrão de cada amostra testada de acordo com a tabela acima.

#### 4 CONCLUSÃO

A partir dos resultados dos testes com células MCF-7 das frações extraídas a partir de microrganismos marinhos, pôde-se confirmar a capacidade de inibição de células MCF-7 das frações da amostra A26, destacando-se as frações A26 F-1 (fração acetato de etila) e A26 F-5 (fração metanólica).

Para a amostra MS122 (R) de acordo com os resultados, a fração n-butanol estimulou consideravelmente o crescimento das células cancerígenas.

Os resultados deste trabalho demonstram que os isolados de *Streptomyces sp.* provenientes de processo de extração com diferentes solventes apresentaram um amplo espectro de potencial metabólito, o que pode ser observado não somente pelo número, mas também pela capacidade de inibição e estímulo das células cancerígenas. Este estudo preliminar demonstrou o promissor potencial destes microrganismos.

## REFERÊNCIAS

APOSTOLI, P. La speciazione dei metalli in medicina del lavoro. **Occupational Health and Industrial Medicine**, v. 35, n. 1, p. 9-10, 1998. ISSN 0014-4398.

ASOLKAR, R. N. et al. Arenimycin, an antibiotic effective against rifampin- and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from the marine actinomycete *Salinispora arenicola*. **The Journal of antibiotics**, v. 63, n. 1, p. 37, 2010.

BAKER, D. D. et al. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. **Natural product reports**, v. 24, n. 6, p. 1225-1244, 2007.

BERDY, J. Recent advances in and prospects of antibiotic research. **Process Biochemistry**, v. 15, p. 28, 1980. ISSN 0032-9592.

BERDY, J. Bioactive microbial metabolites. **The Journal of antibiotics**, v. 58, n. 1, p. 1-26, 2005. ISSN 0021-8820.

BIBB, M. J. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. **Current opinion in microbiology**, v. 8, n. 2, p. 208-215, 2005. ISSN 1369-5274.

BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Natural product reports**, v. 26, n. 2, p. 170, 2009. ISSN 0265-0568.

BODE, H. B. et al. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. **ChemBioChem**, v. 3, n. 7, p. 619-627, 2002. ISSN 1439-7633.

BREDHOLDT, H. et al. Rare actinomycete bacteria from the shallow water sediments of the Trondheim fjord, Norway: isolation, diversity and biological activity. **Environmental microbiology**, v. 9, n. 11, p. 2756-2764, 2007. ISSN 1462-2920.

BRUNS, A. et al. *Aeromicrobium marinum* sp. nov., an abundant pelagic bacterium isolated from the German Wadden Sea. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 53, n. 6, p. 1917-1923, 2003. ISSN 1466-5026.

BRUNTNER, C. et al. Frigocyclinone, a Novel Angucyclinone Antibiotic Produced by a *Streptomyces griseus* Strain from Antarctica†. **The Journal of antibiotics**, v. 58, n. 5, p. 346-349, 2005. ISSN 0021-8820.

BUGNI, T. S.; IRELAND, C. M. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. **Natural Product Reports**, v. 21, n. 1, p. 143-163, 2004.

CHANDRAMOHAN, D.; RAMU, S.; NATARAJAN, R. Cellulolytic activity of marine streptomycetes. **Current Science**, v. 41, n. 7, p. 241-224, 1972. ISSN 0011-3891.

CHAROENSOPHARAT, K. et al. Antibacterial substance produced by *Streptomyces* sp. No. 87. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 9, 2008. ISSN 1684-5315.

CHENG, Y.; FANG, A.; DEMAIN, A. Effect of amino acids on rapamycin biosynthesis by *Streptomyces hygroscopicus*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 43, n. 6, p. 1096-1098, 1995. ISSN 0175-7598.

COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; MORAES, M. O. Brazilian Anticancer Botanical Agents. In: WATSON, R. R. e PREEDY, V. R. (Ed.). **Botanical medicine in clinical practice**: CABI, cap. 29, 2008. ISBN 184593413X.

CRAGG, G. M.; KINGSTON, D. G. I.; NEWMAN, D. J. **Anticancer Agents from Natural Products**. Taylor & Francis, 2011. ISBN 9781420039658.

CUETO, M. et al. Pestalone, a new antibiotic produced by a marine fungus in response to bacterial challenge. **Journal of natural products**, v. 64, n. 11, p. 1444-1446, 2001. ISSN 0163-3864.

DAS, S.; LYLA, P.; KHAN, S. A. Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspectives. **Current Science**, v. 90, n. 10, p. 1325-1335, 2006. ISSN 0011-3891.

DEMAIN, A. L.; ZHANG, L. Natural products and drug discovery. In: (Ed.). **Natural Products**: Springer, p. 3-29, 2005. ISBN 1588293831.

DOULL, J. L.; VINING, L. C. Nutritional control of actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3 (2): suppressive effects of nitrogen and phosphate. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 32, n. 4, p. 449-454, 1990. ISSN 0175-7598.

EIN-GIL, N. et al. Presence of *Aspergillus sydowii*, a pathogen of gorgonian sea fans in the marine sponge *Spongia obscura*. **The ISME journal**, v. 3, n. 6, p. 752-755, 2009. ISSN 1751-7362.

ELY, R.; SUPRIYA, T.; NAIK, C. Antimicrobial activity of marine organisms collected off the coast of South East India. **Journal of experimental marine biology and ecology**, v. 309, n. 1, p. 121-127, 2004. ISSN 0022-0981.

EPIFANIO, R. A.; MAIA, L. F.; FENICAL, W. Chemical defenses of the endemic brazilian gorgonian *Lophogorgia violacea* Pallas (Octocorallia, Gorgonacea). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 11, p. 584-591, 2000.

FELING, R. H. et al. Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinospora*. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 42, n. 3, p. 355-357, 2003. ISSN 1521-3773.

FENICAL, W.; JENSEN, P. R. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. **Nature chemical biology**, v. 2, n. 12, p. 666-673, 2006. ISSN 1552-4450.

FOURATI-BEN FGUIRA, L. et al. Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. strain US80. **Research in Microbiology**, v. 156, n. 3, p. 341-347, 2005. ISSN 0923-2508.

GESHEVA, V.; IVANOVA, V.; GESHEVA, R. Effects of nutrients on the production of AK-111-81 macrolide antibiotic by *Streptomyces hygroscopicus*. **Microbiological research**, v. 160, n. 3, p. 243-248, 2005. ISSN 0944-5013.

GOODFELLOW, M.; HAYNES, J. Actinomycetes in marine sediments. **Biological, biochemical and biomedical aspects of actinomycetes**, p. 453-472, 1984.

GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S. Ecology of actinomycetes. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 189-216, 1983. ISSN 0066-4227.

HACENE, H. et al. H107, a new aminoglycoside anti-*Pseudomonas* antibiotic produced by a new strain of *Spirillospora*. **Microbios**, v. 102, n. 402, p. 69-77, 1999. ISSN 0026-2633.

HAN, S. K. et al. *Salinibacterium amurskyense* gen. nov., sp. nov., a novel genus of the family Microbacteriaceae from the marine environment. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 53, n. 6, p. 2061-2066, 2003. ISSN 1466-5026.

HEALD, S. C. et al. Physiology, biochemistry and taxonomy of deep-sea nitrile metabolising *Rhodococcus* strains. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 80, n. 2, p. 169-183, 2001. ISSN 0003-6072.



HELMKE, E.; WEYLAND, H. *Rhodococcus marinonascens* sp. nov., an Actinomycete from the Sea. **International journal of systematic bacteriology**, v. 34, n. 2, p. 127-138, 1984. ISSN 1466-5026.

HÖLLER, U. et al. Fungi from marine sponges: diversity, biological activity and secondary metabolites. **Mycological Research**, v. 104, n. 11, p. 1354-1365, 2000. ISSN 0953-7562.

HOSTETTMANN, K.; HAMBURGER, M. Search for new lead compounds of natural origin. In: HOLZGRABE, U. (Ed.). **Pharmazie in unserer Zeit: Perspectives in Medicinal Chemistry**: WILEY-VCH Verlag, v. 23, p.132-132, 1994. ISBN 1615-1003.

IMADA, C. et al. Isolation and characterization of antibacterial substances produced by marine actinomycetes in the presence of seawater. **Actinomycetologica**, v. 21, n. 1, p. 27-31, 2007. ISSN 0914-5818.

IWAI, Y.; OMURA, S. Culture conditions for screening of new antibiotics. **The Journal of antibiotics**, v. 35, n. 2, p. 123, 1982. ISSN 0021-8820.

JENSEN, P. R. et al. Marine actinomycete diversity and natural product discovery. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 87, n. 1, p. 43-48, 2005a. ISSN 0003-6072.

JENSEN, P. R. et al. Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. **Environmental microbiology**, v. 7, n. 7, p. 1039-1048, 2005b. ISSN 1462-2920.

JENSEN, P. R.; MAFNAS, C. Biogeography of the marine actinomycete *Salinispora*. **Environmental microbiology**, v. 8, n. 11, p. 1881-1888, 2006. ISSN 1462-2920.

JENSEN, P. R. et al. Species-specific secondary metabolite production in marine actinomycetes of the genus *Salinispora*. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 4, p. 1146-1152, 2007. ISSN 0099-2240.

JENSEN, P. R. Linking species concepts to natural product discovery in the post-genomic era. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 37, n. 3, p. 219-224, 2010. ISSN 1367-5435.

KANO, K. et al. Mechercharmycins A and B, cytotoxic substances from marine-derived *Thermoactinomyces* sp. YM3-251. **The Journal of antibiotics**, v. 58, n. 4, p. 289-292, 2005. ISSN 0021-8820.

KELECOM, A. Secondary metabolites from marine microorganisms. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 74, p. 151-170, 2002. ISSN 0001-3765.

KHANNA, M.; SOLANKI, R.; LAL, R. Selective isolation of rare actinomycetes producing novel antimicrobial compounds. **International Journal of Advanced Biotechnology Research**, v. 2, n. 3, p. 357-75, 2011.

KIM, S. B.; GOODFELLOW, M. Reclassification of *Amycolatopsis rugosa* Lechevalier et al. 1986 as *Prauserella rugosa* gen. nov., comb. nov. **International journal of systematic bacteriology**, v. 49, n. 2, p. 507-512, 1999. ISSN 1466-5026.

KURTBÖKE, D. Biodiscovery from rare actinomycetes: an eco-taxonomical perspective. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 93, n. 5, p. 1843-1852, 2012. ISSN 0175-7598.

KWON, H. C. et al. Marinomycins AD, antitumor-antibiotics of a new structure class from a marine actinomycete of the recently discovered genus "Marinispora". **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 5, p. 1622-1632, 2006. ISSN 0002-7863.

LAM, K. S. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. **Current opinion in microbiology**, v. 9, n. 3, p. 245-251, 2006. ISSN 1369-5274.

LAM, K. S. New aspects of natural products in drug discovery. **Trends in microbiology**, v. 15, n. 6, p. 279-289, 2007. ISSN 0966-842X.

LANE, A. L.; MOORE, B. S. A sea of biosynthesis: marine natural products meet the molecular age. **Natural product reports**, v. 28, n. 2, p. 411-428, 2011.

LECHEVALIER, M. P.; LECHEVALIER, H. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 20, n. 4, p. 435-443, 1970. ISSN 1466-5026.

LI, F. et al. Chinikomycins A and B: Isolation, Structure Elucidation, and Biological Activity of Novel Antibiotics from a Marine Streptomyces sp. Isolate M045#, 1. **Journal of natural products**, v. 68, n. 3, p. 349-353, 2005. ISSN 0163-3864.

LI, Q.; WANG, G. Diversity of fungal isolates from three Hawaiian marine sponges. **Microbiological research**, v. 164, n. 2, p. 233-241, 2009. ISSN 0944-5013.

LI, Z. Advances in marine microbial symbionts in the China Sea and related pharmaceutical metabolites. **Marine drugs**, v. 7, n. 2, p. 113-129, 2009.

LIU, X. et al. Bioprospecting microbial natural product libraries from the marine environment for drug discovery. **The Journal of antibiotics**, v. 63, n. 8, p. 415-422, 2010. ISSN 0021-8820.

LORENZ, P.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Mactanamide, a new fungistatic diketopiperazine produced by a marine *Aspergillus* sp. **Natural Product Letters**, v. 12, n. 1, p. 55-60, 1998. ISSN 1057-5634.

MACHERLA, V. R. et al. Glaciapyrroles A, B, and C, pyrrolsesquiterpenes from a *Streptomyces* sp. isolated from an Alaskan marine sediment. **Journal of natural products**, v. 68, n. 5, p. 780-783, 2005. ISSN 0163-3864.

MAGARVEY, N. A. et al. Isolation and characterization of novel marine-derived actinomycete taxa rich in bioactive metabolites. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 12, p. 7520-7529, 2004. ISSN 0099-2240.

MALDONADO, L. A. 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. 5, p. 1759-1766, 2005a. ISSN 1466-5026.

MALDONADO, L. A. et al. Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 87, n. 1, p. 11-18, 2005b. ISSN 0003-6072.

MANAM, R. R. et al. Lajollamycin, a Nitro-tetraene Spiro- $\beta$ -lactone- $\gamma$ -lactam Antibiotic from the Marine Actinomycete *Streptomyces nodosus*. **Journal of natural products**, v. 68, n. 2, p. 240-243, 2005. ISSN 0163-3864.

MANN, J. Natural products as immunosuppressive agents. **Natural product reports**, v. 18, n. 4, p. 417-430, 2001.

MARTÍN, J. F.; DEMAIN, A. L. Control of antibiotic biosynthesis. **Microbiological reviews**, v. 44, n. 2, p. 230, 1980.

MAYER, A. et al. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. **Trends in pharmacological sciences**, v. 31, n. 6, p. 255-265, 2010. ISSN 0165-6147.

MAYER, A. et al. Marine pharmacology in 2007–8: Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous system, and other miscellaneous mechanisms of action. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 153, n. 2, p. 191-222, 2011. ISSN 1532-0456.

MIAO, L.; QIAN, P. Y. Antagonistic antimicrobial activity of marine fungi and bacteria isolated from marine biofilm and seawaters of Hong Kong. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 38, p. 231-238, 2005.

MILLER, J. D.; TRENHOLM, H. L. **Mycotoxins in grain**: compounds other than aflatoxin. Eagan Press, 1994. ISBN 9780962440755.

MINCER, T. J.; FENICAL, W.; 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. 7019-7028, 2005. ISSN 0099-2240.

MOLINSKI, T. F. et al. Drug development from marine natural products. **Nature reviews Drug discovery**, v. 8, n. 1, p. 69-85, 2009. ISSN 1474-1776.

MORAN, M. A.; RUTHERFORD, L. T.; HODSON, R. E. Evidence for indigenous *Streptomyces* populations in a marine environment determined with a 16S rRNA probe. **Applied and environmental microbiology**, v. 61, n. 10, p. 3695-3700, 1995. ISSN 0099-2240.

MUTTI, A. Biological monitoring in occupational and environmental toxicology. **Toxicology Letters**, v. 108, n. 2, p. 77-89, 1999. ISSN 0378-4274.

NESTERENKO, O. et al. *Rhodococcus luteus* nom. nov. and *Rhodococcus maris* nom. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 32, n. 1, p. 1-14, 1982. ISSN 1466-5026.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **Journal of natural products**, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007. ISSN 0163-3864.

OLANO, C.; MÉNDEZ, C.; SALAS, J. A. Antitumor compounds from actinomycetes: from gene clusters to new derivatives by combinatorial biosynthesis. **Natural product reports**, v. 26, n. 5, p. 628-660, 2009.

ŌMURA, S. **Macrolide antibiotics: chemistry, biology, and practice**. Academic Press, p. 637, 1984. ISBN 9780125264501.

OSTERHAGE, C. et al. Ascosalipyrrolidinone a, an antimicrobial alkaloid, from the obligate marine fungus *Ascochyta s alicorniae*. **The Journal of organic chemistry**, v. 65, n. 20, p. 6412-6417, 2000. ISSN 0022-3263.

OSTERHAGE, C. et al. Rare Sesquiterpenes from the Algicolous Fungus *Drechslera d ematioidea*. **Journal of natural products**, v. 65, n. 3, p. 306-313, 2002. ISSN 0163-3864.

PISANO, M. A.; SOMMER, M. J.; TARAS, L. Bioactivity of chitinolytic actinomycetes of marine origin. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 36, n. 4, p. 553-555, 1992. ISSN 0175-7598.

PIVETTA, F. et al. Monitoramento biológico: conceitos e aplicações em saúde pública Biological monitoring: concepts and applications in public health. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, n. 3, p. 545-554, 2001.

PROKSCH, P.; EDRADA-EBEL, R.; EBEL, R. Drugs from the sea-opportunities and obstacles. **Marine Drugs**, v. 1, n. 1, p. 5-17, 2003.

PRUDHOMME, J. et al. Marine actinomycetes: a new source of compounds against the human malaria parasite. **Plos One**, v. 3, n. 6, p. e2335, 2008. ISSN 1932-6203.

QIU, D.; RUAN, J.; HUANG, Y. Selective isolation and rapid identification of members of the genus *Micromonospora*. **Applied and environmental microbiology**, v. 74, n. 17, p. 5593-5597, 2008. ISSN 0099-2240.

RAHMAN, H. et al. Novel anti-infective compounds from marine bacteria. **Marine drugs**, v. 8, n. 3, p. 498-518, 2010.

RAINEY, F. A. et al. Phylogenetic analysis of the genera *Rhodococcus* and *Nocardia* and evidence for the evolutionary origin of the genus *Nocardia* from within the radiation of *Rhodococcus* species. **Microbiology**, v. 141, n. 2, p. 523-528, 1995. ISSN 1350-0872.

RAMESH, S.; MATHIVANAN, N. Screening of marine actinomycetes isolated from the Bay of Bengal, India for antimicrobial activity and industrial enzymes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 12, p. 2103-2111, 2009. ISSN 0959-3993.

RIEDLINGER, J. et al. Abyssomicins, inhibitors of the para-aminobenzoic acid pathway produced by the marine *Verrucospora* strain AB-18-032. **The Journal of antibiotics**, v. 57, n. 4, p. 271-279, 2004. ISSN 0021-8820.

SCHIEWE, H.-J.; ZEECK, A. Cineromycins, gamma-butyrolactones and ansamycins by analysis of the secondary metabolite pattern created by a single strain of *Streptomyces*. **The Journal of antibiotics**, v. 52, n. 7, p. 635-642, 1999. ISSN 0021-8820.

SIPKEMA, D.; et al. Marine sponges as pharmacy. **Marine Biotechnology**, v. 7, pag. 142-162, 2005.

SORIA-MERCADO, I. E. et al. Antibiotic terpenoid chloro-dihydroquinones from a new marine actinomycete. **Journal of natural products**, v. 68, n. 6, p. 904-910, 2005. ISSN 0163-3864.

SOTO, A. M. et al. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. **Environmental health perspectives**, v. 103, n. 7, p. 113, 1995.

STACH, J. E. et al. *Williamsia maris* sp. nov., a novel actinomycete isolated from the Sea of Japan. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 54, n. 1, p. 191-194, 2004. ISSN 1466-5026.

STROHL, W. R. Antimicrobials. In: BULL, A. T. (Ed.). **Microbial Diversity and Bioprospecting**: ASM Press, 2004. ISBN 9781555812676.

SUJATHA, P.; BAPI RAJU, K.; RAMANA, T. Studies on a new marine streptomycete BT-408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Microbiological research**, v. 160, n. 2, p. 119-126, 2005. ISSN 0944-5013.

SUN, W. et al. Culture-dependent and culture-independent diversity of Actinobacteria associated with the marine sponge *Hymeniacidon* perleve from the South China Sea. **Antonie van leeuwenhoek**, v. 98, n. 1, p. 65-75, 2010. ISSN 0003-6072.

THAKUR, N. L. et al. Marine molecular biology: an emerging field of biological sciences. **Biotechnology advances**, v. 26, n. 3, p. 233-245, 2008. ISSN 0734-9750.

TIAN, X.-P. et al. *Marinactinospora thermotolerans* gen. nov., sp. nov., a marine actinomycete isolated from a sediment in the northern South China Sea. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 59, n. 5, p. 948-952, 2009. ISSN 1466-5026.

VELHO-PEREIRA, S.; KAMAT, N. Digital image analysis of actinomycetes colonies as a potential aid for rapid taxonomic identification. **Nature Preceedings**, p. 1-13, 2010.



WANG, D.-Z. Neurotoxins from marine dinoflagellates: a brief review. **Marine Drugs**, v. 6, n. 2, p. 349-371, 2008.

WANG, G. Diversity and biotechnological potential of the sponge-associated microbial consortia. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 7, p. 545-551, 2006. ISSN 1367-5435.

WARD, A. C.; BORA, N. Diversity and biogeography of marine actinobacteria. **Current opinion in microbiology**, v. 9, n. 3, p. 279-286, 2006. ISSN 1369-5274.

WATVE, M. G. et al. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? **Archives of microbiology**, v. 176, n. 5, p. 386-390, 2001. ISSN 0302-8933.

WIEGAND, C.; PFLUGMACHER, S. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 203, n. 3, p. 201-218, 2005. ISSN 0041-008X.

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, 2009. ISSN 0167-7799.

WILLIAMS, P. G. et al. New cytotoxic Salinosporamides from the marine actinomycete *Salinispora tropica*. **The Journal of organic chemistry**, v. 70, n. 16, p. 6196-6203, 2005. ISSN 0022-3263.

XIAO, J. et al. *Serinicoccus profundus* sp. nov., an actinomycete isolated from deep-sea sediment, and emended description of the genus *Serinicoccus*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 61, n. 1, p. 16-19, 2011. ISSN 1466-5026.

ZHANG, J.-Y. et al. Anthracenedione derivatives as anticancer agents isolated from secondary metabolites of the mangrove endophytic fungi. **Marine Drugs**, v. 8, n. 4, p. 1469-1481, 2010.

ZHANG, Y. et al. Calculation of radiative fluxes from the surface to top of atmosphere based on ISCCP and other global data sets: Refinements of the radiative transfer model and the input data. **Journal of Geophysical Research: Atmospheres** (1984–2012), v. 109, n. D19, 2004. ISSN 2156-2202.