BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo
n: 19.624

recebido em
14/12/01
NÃO LICENCIADO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

**Purificação e caracterização de antraciclinas
antibióticas de uma linhagem mutante de
Streptomyces olindensis DAUFPE 5622**

LEANDRO RIBEIRO LATORRE

Dissertação de Mestrado

orientador:

MASSUO JORGE KATO

SÃO PAULO

25/05/2001

• T
547.7
L358-p

DEDALUS - Acervo - CQ

30100003891

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

L358p Latorre, Leandro Ribeiro
Purificação e caracterização de antraciclinas antibióticas de uma
linhagem mutante de *Streptomyces olindensis* DAUFPE 5622 /
Leandro Ribeiro Latorre. -- São Paulo, 2001.
71p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Kato, Massuo Jorge

1. Produtos naturais: Química orgânica 2. Biotecnologia 3.
Microbiologia 4. Microrganismos I. T. II. Kato, Massuo
Jorge, orientador.

547.7 CDD

**"Purificação e Caracterização de Antraciclinas
Antibióticas de uma Linhagem Mutante de
Streptomyces olindensis DAUFPE 5622"**

LEANDRO RIBEIRO LATORRE

*Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos
necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências – Área:
Química Orgânica.*

Aprovado por:

Prof. Dr. MASSUO JORGE KATO
IQ - USP
(Orientador e Presidente)

Prof. Dr. PAULO ROBERTO HRIHOROWITSCH MORENO
IQ - USP

Profa. Dra. PAULETE ROMOFF
Mackenzie

SÃO PAULO
25 DE MAIO 2001.

"Tua caminhada ainda não terminou....

*A realidade te acolhe dizendo que pela frente
o horizonte da vida necessita de tuas palavras e do teu silêncio.*

*Se amanhã sentires saudades,
lembra-te da fantasia e sonha com tua próxima vitória.*

*Vitória que todas as armas do mundo jamais conseguirão obter,
porque é uma vitória que surge da paz e não do ressentimento.*

*É certo que irás encontrar situações tempestuosas novamente,
mas haverá de ver sempre o lado bom da chuva que cai
e não a faceta do raio que destrói.*

*Se não consegues entender que o céu deve estar dentro de ti,
é inútil buscá-lo acima das nuvens e ao lado das estrelas.*

*Por mais que tenhas errado e erres,
para ti haverá sempre esperança enquanto te envergonhares de teus erros.*

*Tu és jovem.
Atender a quem te chama é belo,
lutar por quem te rejeita é quase chegar a perfeição.*

*A juventude precisa de sonhos e se nutrir de lembranças,
assim como o leito dos rios precisa da água que rola e o coração necessita de
afeto.*

*Não faças do amanhã o sinônimo de nunca,
nem o ontem te seja o mesmo que nunca mais.*

Teus passos ficaram.

*Olhes para trás...
mas vá em frente pois há muitos que precisam que chegues para poderem
seguir-te.*

- Charles Chaplin -

*"As pessoas podem não se lembrar exatamente o que você fez,
ou o que você disse, mas elas sempre se lembrarão
de como você as fez sentir."*

À minha família e alguns grandes amigos,
que sempre me ensinaram, incentivaram, confiaram e acreditaram em mim,
muitas vezes mais do que eu mesmo...

A GRADECIMENTOS

Ao Massuo, pela oportunidade de ingressar no Laboratório de Produtos Naturais como técnico e como aluno.

Aos amigos do Mackenzie: Ana Paula, Patrícia e Sílvia pela amizade e incentivo desde a época da graduação.

Ao Sérgio Luiz Pereira, pelo estímulo, apoio e companheirismo.

Aos alunos, funcionários e professores com quem convivi em algum momento desde o meu ingresso no LQPN e que de alguma forma me apoiaram, deram idéias, ajuda ou simplesmente gastaram seu tempo conversando: Alessandra, Ana Cristina, Ana Luíza, Ana Paula Santos, Andréa Luzia, Angélica, Carol, Cecília, Clara, Claudinha, Clécio, Consuelo, Diego, Dulce, Ernani, Eva, Fabiana, Fabiano, Farah, Fátima, Fernanda, Guillermo, Ingrid, Isabel, Jaqueline, João, Karine, Kênnia, Luce, Luciana Retz, Mara, Marcelo, Marden, Mariana, D. Marina (em memória), Marise, Massayoshi, Melânia, Nídia, Nihei, Norberto, Paulete, Paulo Benevides, Paulo Moreno, Regina, Roberto, Rute, Serginho, Sérgio, Toledo, Vanderlan, Vicente, Zé Antonio.

Ao Pio Colepicolo pela oportunidade de colaborar em alguns trabalhos no seu laboratório e aos seus alunos, pela amizade.

A todas as outras pessoas que de alguma forma participaram no desenvolvimento deste trabalho ou simplesmente conviveram comigo durante estes quase 6 anos no LQ.

*"Muitas pessoas passam por nossa vida,
algumas levam muito de nós consigo e outras não levam nada,
outras deixam muito de si conosco, mas não há pessoa que não nos deixe algo"*

RESUMO

A espécie *Streptomyces olindensis* DAUFPE 5622 produz o complexo antibiótico retamicina, que apresenta atividade contra leucemia em seres humanos mas possui limitações de uso devido ao seu grande efeito cardiotóxico. Uma linhagem mutante de *S. olindensis*, So20, obtida por tratamento da linhagem selvagem com MMS (metanossulfonato de metila), apresentou diferença qualitativa quanto à produção deste complexo antibiótico. O extrato metanólico das células desta linhagem mutante sofreu diversos tratamentos com solventes orgânicos e foi submetido a diversas técnicas de separação cromatográfica. Algumas substâncias foram parcialmente isoladas e foram submetidas a análise espectrométrica, que indicaram diferenças nas suas estruturas com relação ao complexo obtido da linhagem selvagem DAUFPE 5622. Algumas destas frações parcialmente purificadas da linhagem mutante foram testadas quanto a sua atividade antimicrobiana, contra *Bacillus subtilis* 007, e quanto sua capacidade de intercalação em fragmentos de DNA em gel de eletroforese, no ICB-USP, indicando resultados promissores.

A BSTRACT

Streptomyces olindensis DAUFPE 5622 species produces the antibiotic complex retamycin, which are active against human leukemia, but is still not used in human treatments due to its cardiotoxic effects. The *S. olindensis* mutant, So20, obtained by treatment with MMS (methyl methanesulfonate), showed qualitative differences in the antibiotic production. The methanolic extract from these mutant strains cells was purified by means of solvent partition and by chromatographic purification techniques. Some compounds were partially purified and the analysis of their spectrometric data indicated structural differences from that obtained from DAUFPE 5622 strains. Some of these partially purified substances from mutant strains were tested for their antimicrobial activity, against *Bacillus Subtilis* 007, and for their DNA intercalation ability on eletroforesis gel, in the ICB-USP laboratories, showing promising results.

A BREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcOEt	: acetato de etila
CC	: cromatografia em coluna
CCDC	: cromatografia em camada delgada comparativa
CCDP	: cromatografia em camada delgada preparativa
CCDRP	: cromatografia em camada delgada radial preparativa
CLAE	: cromatografia líquida de alta eficiência
CLMP	: cromatografia líquida de média pressão
d	: dubleto
Da	: Dalton
DAUFPE	: Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco
DCM:	: diclorometano
dd	: duplo dubleto
DNA	: ácido desoxirribonucléico
e	: elétron
EM	: espectrometria de massas
ES+	: ionização por “electrospray” em modo positivo
g	: aceleração da gravidade
IE	: ionização por impacto de elétrons
IV	: infra-vermelho
J	: constante de acoplamento
Kb	: quilobase (10^3 bases ou pares de bases)
m	: múltiplo
MeOH	: metanol
m/z	: relação massa/carga
NADPH	: fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (reduzido)
pb	: pares de bases
q	: quarteto
R_f	: fator de retenção
t_R	: tempo de retenção
RMN-¹H	: ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN-¹³C	: ressonância magnética nuclear de carbono
RNA	: ácido ribonucléico
rpm	: rotações por minuto

s	: singleto
SAM	: S-adenosilmetionina
sl	: singleto largo
t	: tripleto
TDP-	: timidina difosfo-
TMS	: tetrametilsilano
UV	: ultravioleta
V	: Voltz
VIS	: visível
vvm	: volume de ar por volume de meio por minuto
δ	: deslocamento químico
λ	: comprimento de onda

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Gênero <i>Streptomyces</i>	1
1.1.1. <i>Streptomyces olindensis</i> DAUFPE 5622	2
1.1.2. Linhagem mutante So20	3
1.2. Antraciclinas	3
1.2.1. Biossíntese das antraciclinas	10
2. OBJETIVOS	13
3. PARTE EXPERIMENTAL	14
3.1. Crescimento das células de <i>S. olindensis</i>	14
3.2. Extração e purificação do complexo antibiótico	14
3.2.1. Cromatografia em coluna (CC)	16
3.2.2. Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)	17
3.2.3. Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)	17
3.2.4. Cromatografia em camada delgada radial preparativa (<i>Chromatotron</i>) (CCDRP)	18
3.2.5. Cromatografia líquida de alta eficiência - analítica (CLAE)	19
3.2.6. Cromatografia líquida de alta eficiência - semi-preparativa (CLAE)	20
3.2.7. Cromatografia líquida de média pressão (CLMP)	21
3.3. Reações de hidrólise do complexo antibiótico	22
3.3.1. Hidrólise do precipitado	22
3.3.2. Hidrólise da suspensão celular	23
3.4. Teste de atividade antimicrobiana	24
3.5. Material e equipamentos utilizados	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1. Extração do complexo antibiótico	28

4.2. Fracionamentos por cromatografia e caracterizações espectroscópicas	31
4.3. Reações de hidrólise do complexo antibiótico	57
4.4. Testes de atividade biológica	59
4.4.1. Teste de atividade antimicrobiana	59
4.4.2. Teste de intercalação do antibiótico em fragmentos de DNA em gel de eletroforese “shift”	59
5. CONCLUSÕES	63
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

SUMÁRIO DE FIGURAS

Figura 01: Estrutura da doxorubicina	1
Figura 02: Estrutura da retamicina E1 e retamicina E2	2
Figura 03: Estrutura da daunomicina	5
Figura 04: Estrutura da aclacinomicina A	5
Figura 05: Estruturas da idarrubicina, epirubicina, pirarrubicina e zorrubicina	9
Figura 06: Comparação entre as etapas de formação dos ácidos graxos e policetídeos	11
Figura 07: Fluxograma da biossíntese da doxorubicina	12
Figura 08: Procedimento utilizado na extração e purificação do complexo antibiótico de células de <i>S. olindensis</i>	15
Figura 09: Procedimento utilizado na cromatografia em coluna	16
Figura 10: Procedimento utilizado na cromatografia em camada delgada preparativa	17
Figura 11: Procedimento utilizado na cromatografia em camada delgada radial preparativa	18
Figura 12: Procedimento utilizado na cromatografia líquida de alta eficiência - analítica	19
Figura 13: Procedimento utilizado na cromatografia líquida de alta eficiência - semi-preparativa	20
Figura 14: Procedimento utilizado na cromatografia líquida de média pressão	21
Figura 15: Procedimento utilizado na hidrólise do complexo antibiótico a partir do precipitado “ppt-ret-M”	22
Figura 16: Procedimento utilizado na hidrólise do complexo antibiótico a partir da suspensão celular do fermentador	23
Figura 17: Estruturas das agliconas identificadas após hidrólise do complexo antibiótico extraído de <i>S. olindensis</i> DAUFPE 5622	28
Figura 18: Açúcares identificados após hidrólise do complexo antibiótico extraído de <i>S. olindensis</i> DAUFPE 5622	29
Figura 19: Espectro na região do UV / VIS do complexo antibiótico extraído das células de <i>S. olindensis</i> So20	29
Figura 20: Cromatogramas obtidos por CLAE dos complexos antibióticos obtidos de <i>S. olindensis</i>	30

Figura 21: Separação do complexo antibiótico extraído de <i>S. olindensis</i> So20 por CCDP, visualizado na região do visível	32
Figura 22: Cromatograma obtido por CLAE da fração FrR1-3	33
Figura 23: Espectro de massas (ES+) da fração FrR1-3	34
Figura 24: Cromatograma obtido por CLAE da fração FrR1-8	35
Figura 25: Espectro de massas (ES+) da fração FrR1-8	36
Figura 26: Cromatograma obtido por CLAE da fração FrR1-11	37
Figura 27: Espectro de massas (ES+) da fração FrR1-11	38
Figura 28: Cromatograma obtido por CLAE da fração HP3	39
Figura 29: Espectro de RMN-¹H (500MHz) em CDCl₃ da fração HP3	40
Figura 30: Possíveis constituintes da fração HP3	42
Figura 31: Espectro no IV da fração HP3	43
Figura 32: Espectro de massas (IE, 70eV) da fração HP3	45
Figura 33: Espectro de massas (ES+) da fração HP3	46
Figura 34: Cromatograma obtido por CLAE da fração M1	47
Figura 35: Espectro de RMN-¹H (500MHz) em MeOD da fração M1	48
Figura 36: Espectro no UV / VIS da fração M1	49
Figura 37: Espectro no IV da fração M1	50
Figura 38: Espectro de massas (IE, 30eV) da fração M1	52
Figura 39: Espectro de massas (ES+) da fração M1	53
Figura 40: Cromatograma obtido por CLAE da fração M7	54
Figura 41: Cromatograma obtido por CLAE da fração M9	54
Figura 42: Espectro de massas (ES+) da fração M7	55
Figura 43: Espectro de massas (ES+) da fração M9	56
Figura 44: Cromatograma obtido por CLAE da fração M4	57
Figura 45: Espectros no UV / VIS do complexo antibiótico antes e depois das reações de hidrólise	58
Figura 46: Gel de eletroforese do teste de intercalação da fração FrR1-3 (diferentes concentrações) no fragmento de DNA	60
Figura 47: Gel de eletroforese do teste de intercalação da fração FrR1-8 (diferentes concentrações) no fragmento de DNA	60
Figura 48: Gel de eletroforese do teste de intercalação da fração FrP1-9 (diferentes concentrações) no fragmento de DNA	61
Figura 49: Gel de eletroforese do teste de intercalação das frações obtidas por CLAE no fragmento de DNA	61
Figura 50: Gel de eletroforese do teste de intercalação da fração FrR1-8 (diferentes concentrações) no fragmento de DNA	62

1. INTRODUÇÃO

1.1. Gênero *Streptomyces*

Streptomyces é um gênero da família Streptomycetaceae constituído de bactérias Gram-positivas, filamentosas, aeróbias, encontradas no solo e em ambientes aquáticos. Pertence à ordem Actinomycetales, a qual é responsável pela produção de dois terços dos antibióticos conhecidos produzidos por microrganismos. O gênero *Streptomyces* é responsável pela produção de oitenta por cento destas substâncias (Kieser *et al.*, 2000).

As espécies de *Streptomyces* são responsáveis, também, pela produção de outras classes de metabólitos secundários com atividade biológica. Dentre estas estão as antraciclinas, produtos naturais estudados intensivamente devido a atividade antitumoral que apresentam. A principal destas substâncias, a doxorrubicina (Figura 1), foi primeiramente aprovada para o uso contra o câncer em 1974 e tem sido desde então o mais usado e bem sucedido agente anticâncer desenvolvido (Kieser *et al.*, 2000; Strohl *et al.*, 1999).

Figura 1: Estrutura da doxorrubicina.

1.1.1. *Streptomyces olindensis* DAUFPE 5622

A espécie *Streptomyces olindensis*, isolada do solo em Olinda e estudada durante as décadas de 60 e 70 no Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, produz o complexo antraciclínico denominado retamicina (Figura 2). Este complexo, de cor vermelha, é constituído por uma mistura de antraciclinas que apresenta relevante ação antibiótica e antitumoral (Lima *et al.*, 1969; Monache *et al.*, 1970; Bieber *et al.*, 1989).

Figura 2: Estrutura da retamicina E1 ($\text{R}=\text{H}$) e retamicina E2 ($\text{R}=\text{OH}$).

A ampla atividade antitumoral deste complexo contra diversos tipos de tumores sólidos deu origem a outros estudos pré-clínicos e farmacológicos, sendo o primeiro resultado positivo observado no tratamento de leucemia em seres humanos (inibição da síntese do DNA em células P388 de leucemia "in vitro"). Mesmo assim, a retamicina não é ainda utilizada como droga no tratamento de câncer devido ao efeito colateral cardiotoxico que apresenta (Bieber *et al.*, 1989; Furlan, 1997).

1.1.2. Linhagem mutante So20

A obtenção de cepas mutantes de *Streptomyces* produtores de antibióticos é uma técnica emergente e pronta a se tornar estabelecida como uma metodologia de sucesso no desenvolvimento de substâncias análogas as originais - produtos naturais obtidos de organismos - de importância farmacêutica (Kunnari *et al.*, 2000; Miyamoto *et al.*, 1998; Hutchinson e Colombo, 1999).

Uma linhagem mutante a partir de *Streptomyces olindensis* DAUFPE 5622 foi obtida pelo Laboratório de Genética de Microrganismos do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, utilizando-se o agente mutagênico químico metanossulfonato de metila (MMS) (Furlan, 1997).

Segundo um estudo ainda preliminar da atividade citotóxica, foi observado que apesar da linhagem mutante So20 produzir mais antibiótico que a linhagem selvagem DAUFPE 5622, a citotoxicidade observada foi a mesma para os produtos extraídos das duas linhagens. Mesmo assim, uma amostra de retamicina apresentou atividade citotóxica menor que o antibiótico doxorubicina, atualmente comercializado (Furlan, 1997).

1.2. Antraciclinas

As antraciclinas estão entre os produtos naturais mais intensivamente estudados durante as três últimas décadas devido, em parte, à atividade antitumoral e toxicidade que apresentam (Strohl *et al.*, 1999).

Tem sido amplamente aceito que o desenvolvimento de antibióticos é um dos progressos mais importantes na medicina. Num sentido mais estrito, o mesmo poderia ser dito a respeito da importância da doxorubicina (Figura 1) no tratamento quimioterápico de câncer. A aprovação do seu uso como agente anti-câncer está para completar três décadas e ao contrário da maioria das drogas antitumorais, incluindo outras antraciclinas, a doxorubicina apresenta notável atividade contra uma ampla variedade de tumores (Strohl *et al.*, 1999). Sua ação envolve a inibição da síntese de RNA a

partir do DNA, uma vez que sua molécula planar se intercala entre os pares de bases da hélice do DNA. A sua unidade de açúcar estabelece fortes ligações com o DNA e também desempenha importante função no reconhecimento da sequência para a ligação (Dewick , 1997).

Os antibióticos antraciclínicos são glicosídeos de antraciclínonas, dos quais a estrutura base é a 7,8,9,10-tetraidro-5,12-naftacenoquinona. Nos anos 50 Brockmann e Bauer (1950) isolaram as rodomicinas a partir de *Streptomyces purpurascens*, as quais apresentaram potente atividade antimicrobiana. Em 1959 as cinerubinas, isoladas de *Streptomyces antibioticus*, mostraram atividade contra bactérias Gram-positivas e certos fungos, citotoxicidade para culturas de fibroblastos de galinha e inibição de vários sarcomas e carcinomas. Porém, a alta toxicidade observada em camundongos e ratos evitaram o seu desenvolvimento como agentes antitumorais.

Di Marco *et al.*, 1964, descobriram a daunomicina (Figura 3), uma antraciclina que se tornou a primeira clinicamente efetiva no tratamento de leucemias agudas. A doxorrubicina, também conhecida como adriamicina, foi isolada de *Streptomyces peucetius* var. *caesius*, em 1967 pela Farmitália e, logo após, foi descoberta como sendo menos tóxica e ativa contra um espectro muito mais amplo de tumores do que a daunomicina. Estudos mostraram sua eficácia contra câncer de mama, sarcoma osteogênico, cânceres de bexiga, pulmão, tireóide e ovário, tumor de Wilm, neuroblastoma, doença de Hodgkin e outros linfomas e leucemias agudas. Porém, seus efeitos colaterais como a cardiotoxicidade, estimularam esforços adicionais para o descobrimento de outros antibióticos antraciclínicos. A aclacinomicina (Figura 4) foi isolada em 1975 de *Streptomyces galilaeus* e mostrou potente ação contra leucemia e baixa cardiotoxicidade. As aclacinomicinas têm sido utilizadas sob prescrição médica especialmente no Japão e países Asiáticos (Fujii e Ebizuka, 1997).

Figura 3: Estrutura da daunomicina.

Figura 4: Estrutura da aclacinomicina A.

O uso das antraciclina tem sido primeiramente limitado devido aos seus efeitos colaterais que podem conduzir a falhas cardíacas. Mesmo havendo uma relação linear entre a dose cumulativa recebida e a incidência da cardiotoxicidade, em alguns pacientes a cardiotoxicidade pode se desenvolver mesmo com doses abaixo daquelas que geram níveis aceitos de efeitos colaterais.

Acredita-se que a cardiotoxicidade induzida pelas antraciclina seja relacionada com a geração de espécies ativas de oxigênio, as

quais, por meio de peroxidação de lipídios das membranas, causam danos diretos às membranas de miócitos cardíacos. Outro fator importante pode ser a defesa antioxidante relativamente pobre nos tecidos do coração (Meinardi *et al.*, 1999; Horenstein *et al.*, 2000).

Efeitos tardios, ou sequelas, provenientes de tratamentos com radiação ou agentes quimioterapêuticos em pacientes infantis com leucemia linfoblástica aguda e outros tipos de tumores sólidos podem ser sérios. Dependendo do tratamento aplicado, estes pacientes podem apresentar cirrose, hepatite C ou cardiomiopatia, decorrente do uso de antraciclinas. Acredita-se que fatores como o sexo e idade dos pacientes são muito importantes no que se diz respeito à cardiotoxicidade decorrente do uso destas substâncias (Iarussi *et al.*, 2000; Oeffinger *et al.*, 2000).

Estudos recentes mostram que o uso de antraciclinas (doxorrubicina) no tratamento quimioterápico do câncer de mama, na fase inicial, não leva à sequelas cardíacas clínicas suficientes que possam contrabalancear com os benefícios aos pacientes, os quais podem ser curados da doença (Zambetti *et al.*, 2001).

A presença de neoplasmas secundários e cardiotoxicidade têm sido reconhecidos como eventos secundários letais em potencial para pacientes tratados do mal de Hodgkin (Aviles *et al.*, 2000).

O estudo de novas antraciclinas envolve a busca de maior eficácia ou um maior espectro de atividade antineoplásica com relação à doxorrubicina ou daunomicina, bem como, um efeito cardiotóxico menor. (Pratesi e Monestiroli, 2001). Apesar destes inúmeros esforços, os compostos desta classe inicialmente obtidos ainda continuam sendo os melhores agentes quimioterápicos (Chaires *et al.*, 1997), mas outros análogos continuam sendo sintetizados e testados (Takagi *et al.*, 1996; Fenick *et al.*, 1997; Bakina *et al.*, 1997; Florent *et al.*, 1998; Ogawa, 1999; Minotti *et al.*, 2000; Salminen *et al.*, 2000; Nabholz *et al.*, 2001). Até o momento, mais de 2000 análogos de antraciclinas já foram isolados ou sintetizados em laboratórios, em um esforço para se encontrar um análogo superior da doxorrubicina, ou seja, uma antraciclina com maior eficácia e menor efeito colateral. Nesse sentido, um grande número de antraciclínas produzidas por *Streptomyces* foram isolados

(Tabela I). No entanto, somente cinco novas antraciclinas foram desenvolvidas para uso clínico mundial desde a doxorubicina: idarrubicina, epirubicina, pirarubicina, zorrubicina e aclacinomicina A (Figuras 4 e 5) (Strohl *et al.*, 1999).

Tabela I: Antraciclinas produzidas por *Streptomyces*

Gênero	Produto
<i>S. achromogenes</i>	protorubradirina rubradirina
<i>S. atrovioleaceus</i>	13-diidrocarminomicina
<i>S. avidinii</i>	avidinorrubicina
<i>S. bifurcus</i>	daunorrubicina
<i>S. bibili</i>	cinerrubina, rodomicinas X, Y
<i>S. capoamus</i>	cinerrubinas
<i>S. chromofuscus</i>	aranciamicina
<i>S. cinereoruber</i>	cinerrubinas
<i>S. coeruleorubidus</i>	daunorrubicina, baumicinas A, B, C
<i>S. coeruleorubidus</i>	daunorrubicina, baumicinas, 13-diidrodaunorrubicina
<i>S. cosmosus</i>	cosmocarcina A, ditrisarrubicina A, B
<i>S. diastatochromogenes</i>	tripanomicina A ₂
<i>S. algreteus</i>	stefimicina B
<i>S. eurythermus</i>	cinerrubina R
<i>S. galilaeus</i>	1-hidroxiauramicinas, 1-hidroxisulfuromicinas, galirrubinas, pirromicina, aclavinona, aclacinomicina A, cinerrubinas, auramicina, sulfuromicinas, 2-hidroxiacclacinomicina A, 2-hidroxiacclavinona, aclavicetona
<i>S. glaucescens</i>	tetracenomicina C
<i>S. glomeratus</i>	berromicinas, nogalamicina
<i>S. griseoruber</i>	berromicinas A, B, C, daunorrubicina
<i>S. griseorubiginosus</i>	cinerrubinas
<i>S. griseus</i>	leucaemomicinas, daunorrubicina
<i>S. insignis</i>	daunorrubicina, ε-rodomicinona
<i>S. melanogenes</i>	1-hidroxiauramicinas, 1-hidroxisulfuromicinas
<i>S. niveoruber</i>	cinerrubinas
<i>S. nogalater</i>	nogalamicina
<i>S. olindensis</i>	retamicina E1, E2
<i>S. olivaceus</i>	eloramicina A

<i>S. peucetius</i>	daunorrubicina, baumicinas, doxorrubicina, 11-desoxodaunorrubicina, 13-desoxocarminomicina, 13-diidrodaunorrubicina, 4-0-glucuronídeos de aclavinona, ε-rodomicinona
<i>S. purpurascens</i>	rodomicina I, isorodomicina, rodomicinonas
<i>S. ryensis</i>	riemicinas A ₁ e A ₂
<i>S. steffisbergensis</i>	steffimicina B
<i>S. tauricus</i>	tauromicetina
<i>S. triangulatus</i>	derivado de baumicina
<i>S. violaceochromogenes</i>	cinerrubina X
<i>S. violaceus</i>	mistura de rodomicinona, b-rodomicinona, epelicina A-E, obelmicina A-G, ielamicina A-C
<i>S. violochromogenes</i>	arrugomicina
<i>S. virginiae</i>	decilorrubicina
<i>S. viridochromogenes</i>	daunorrubicina
<i>S. xanthocidicus</i>	respinomicina A1, A2, B, C, D

idarrubicina

epirubicina

pirarubicina

zorubicina

Figura 5: Estruturas da idarrubicina, epirubicina, pirarubicina e zorubicina.

1.2.1. Biossíntese das antraciclinas

As antraciclinas pertencem à classe dos policetídeos aromáticos, substâncias naturais que contém múltiplos grupos carbonílicos e hidroxílicos, separados uns dos outros por um átomo de carbono: $-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-$. Tanto os policetídeos como os ácidos graxos são derivados de reações de condensação de Claisen envolvendo acetil-CoA ou acil-CoAs relacionadas.

Os mecanismos de formação de ambas as classes de substâncias envolvem quatro tipos de reações e as unidades monoméricas formadoras são as mesmas. Estas unidades monoméricas podem ser de diversos tipos, como: resíduos de acetato, propionato, butirato e, as vezes, mais complexos (Hopwood e Sherman, 1990; Hutchinson e Fujii, 1995), sempre na forma de tioésteres.

A diferença entre a formação dos ácidos graxos e os policetídeos está na forma com que estas reações e os monômeros são combinados: os policetídeos podem ser formados a partir de mais de um tipo de monômero, através de uma quantidade de permutações quase sem limite dos passos da biossíntese dos ácidos graxos (Figura 6) (Hutchinson e Fujii, 1995).

A rota biossintética de uma antraciclina bem conhecida, a doxorubicina (Figura 1), com as várias etapas da biossíntese detalhadas é mostrada na Figura 7 (Dewick, 1997).

Figura 6: Comparação entre as etapas de formação dos ácidos graxos (A) e policetídeos (B). I. Condensação de acetil-CoA (unidade iniciadora) com malonil-CoA (unidade de extensão da cadeia de carbonos) para produção de 3-oxobutiriltioéster. II. redução do grupo carbonila na posição 3 para hidroxila. III. Desidratação deste grupo hidroxila para produzir uma ligação dupla conjugada com a carbonila do tioéster. IV. Redução desta dupla ligação para formar o butiriltioéster. E. enzima; [2H], redução; (I-IV)_n indica repetição das etapas I a IV (n vezes); (I), (I,II), (I-III), e (I-IV) indicam que os segmentos estruturais são formados pela operação das etapas indicadas, análogas às indicadas em A (Hutchinson e Fujii, 1995).

Figura 7: Fluxograma da biossíntese da doxorubicina (Dewick, 1997).

2. OBJETIVOS

Este estudo é parte integrante de um programa de pesquisa junto ao CNPq/PADCT envolvendo o Laboratório de Química de Produtos Naturais do Instituto de Química da USP, o Laboratório de Genética de Microrganismos do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, e o Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da USP.

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver uma metodologia para a purificação do antibiótico retamicina e de outras substâncias bioativas, a partir do fracionamento do extrato metanólico de células da linhagem mutante So20 de *Streptomyces olindensis*, cultivadas no Laboratório de Genética de Microrganismos do ICB-USP e crescidas em biorreatores no Departamento de Engenharia Química da EP-USP. Através da comparação qualitativa entre as substâncias produzidas pelas linhagens selvagem e mutante e a execução de testes de atividade biológica das substâncias isoladas, objetivou-se avaliar o potencial desses antibióticos para futuros trabalhos.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Crescimento das células de *S. olindensis* (EP-USP)

A linhagem mutante *S. olindensis* So20 foi cultivada em meio de cultura líquido com a seguinte composição: glicose (10,0g/L); extrato de levedura (5,0g/L); casaminoácidos (0,10g/L); Tris(hidroximetil)aminometano (3,09g/L); K_2SO_4 (0,25g/L) e $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (10,12g/L).

O pH foi ajustado para a faixa de 7,2 a 7,4 e após ser autoclavado durante 20 minutos por 120 °C, foi acrescentado de (quantidades por 250mL de volume total): solução de elementos traço (0,5mL); KH_2PO_4 0,5% p/v (2,5mL) e $CaCl_2$ 5mol/L (1,0mL).

As soluções de KH_2PO_4 e $CaCl_2$ foram autoclavadas separadamente por 20 minutos a 120 °C e a solução contendo elementos traço foi esterilizada por filtração à vácuo.

A composição da solução de elementos traço consiste de (para 1L): $ZnCl_2$ (40mg); $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (200mg); $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ (10mg); $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (10mg) $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ (10mg) e $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ (10mg).

Depois do pré-inóculo ser reativado por 16 horas, as células foram transferidas para reator de 10L de capacidade e cultivadas por 48 horas, nas seguintes condições: pH = 7,0; 500 rpm; 1,0vvm; 0,15bar e 30 °C.

3.2. Extração e purificação do complexo antibiótico

A suspensão celular do experimento com células mutantes obtido de fermentador (EP-USP) (15,4L) foi centrifugado a 6.000 rpm por 15 minutos para separação das células (Figura 8).

As células obtidas (375g) foram extraídas três vezes com MeOH, seguido de filtração.

Figura 8: Procedimento utilizado na extração e purificação do complexo antibiótico de células de *S. olindensis*.

O extrato obtido foi evaporado sob pressão reduzida a 48°C até a eliminação total do solvente orgânico. Em seguida a fase aquosa resultante (3,25g) foi extraída com CHCl_3 até esgotar a coloração vermelha (média de 5 vezes).

Esta fração clorofórmica foi evaporada nas mesmas condições, resultando num sólido amorfo que foi suspenso em hexano e particionado com $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (9:1). Após várias lavagens com hexano, a fração hidrometanólica foi evaporada, suspensa em CHCl_3 , seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada e evaporada.

Numa tentativa de cristalização deste material oleoso resultante (620mg) com hexano (Bieber *et al.*, 1989), houve a formação de flóculos que após um período de repouso foram centrifugados a 10.000g por 15 minutos a 5°C. O precipitado resultante foi dissolvido em CHCl_3 e evaporado, resultando em um pó vermelho denominado “ppt-ret-M” (538mg). Foram obtidos espectros na região do UV, do ppt-ret-M dissolvido em MeOH.

Tratamento semelhante foi utilizado para o caldo dos experimentos com células selvagens cultivadas em agitadores orbitais (ICB-USP), resultando em um pó denominado “ppt-ret-S”.

3.2.1. Cromatografia em coluna (CC)

O ppt-ret-M (435mg) foi fracionado em uma coluna filtrante (3,4cm de diâmetro interno, 10,0cm de altura) utilizando-se gel de sílica (partículas de 0,063-0,200mm) como fase estacionária e eluído com uma mistura de DCM / MeOH, em ordem crescente de polaridade. Foram coletadas 8 frações (FrC2-1 a FrC2-8) de acordo com as bandas observadas na coluna cromatográfica (Figura 9).

Figura 9: Procedimento utilizado na cromatografia em coluna.

3.2.2. Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)

As amostras a serem analisadas por CCDC foram dissolvidas em AcOEt e aplicadas em cromatofolhas de gel de sílica, eluídas com misturas de CHCl_3 / MeOH / ácido fórmico em diversas proporções e visualizadas na luz visível.

3.2.3. Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)

O ppt-ret-M (100mg) foi dissolvido em AcOEt e aplicado em 4 placas preparativas de gel de sílica (partículas de 0,005-0,063mm), eluídas com uma mistura de CHCl_3 /MeOH/ácido fórmico (85:15:2), obtendo-se 9 frações (FrP1-1 a FrP1-9), visualizadas na região do visível (Figura 10).

Figura 10: Procedimento utilizado na cromatografia em camada delgada preparativa.

3.2.4. Cromatografia em camada delgada radial preparativa (*Chromatotron*) (CCDRP)

O ppt-ret-M (25mg) foi dissolvido em CHCl_3 /MeOH/ácido fórmico (90:10:2), aplicado em placa circular de gel de sílica (partículas de 0,005-0,063mm) e eluído com uma mistura de CHCl_3 /MeOH/ácido fórmico (90:10:2) em gradiente de polaridade até MeOH 100% (Tabela II), com fluxo de 2,5 mL/min, obtendo-se 11 frações (FrR1-1 a FrR1-11) de acordo com a observação de bandas na placa, na região do visível (Figura 11).

Tabela II: Gradiente de polaridade utilizado na CCDRP

MeOH	:	CHCl_3	Ácido fórmico	Quantidade (mL)
10		90	2	50
13		87	2	200
15		85	2	100
40		60	2	100
50		50	2	100
70		30	2	100
100		0	2	200

Figura 11: Procedimento utilizado na cromatografia em camada delgada radial preparativa.

3.2.5. Cromatografia líquida de alta eficiência - analítica (CLAE)

As amostras a serem analisadas foram dissolvidas em MeOH/H₂O (pH 2,0, ácido fosfórico) (80:20) na concentração de 1mg/mL e tratadas em cartuchos de extração em fase sólida de sílica de fase reversa C18 (Sep-Pak) para retirada de material graxo (Figura 12).

Figura 12: Procedimento utilizado na cromatografia líquida de alta eficiência (analítica) para as análises das substâncias extraídas de *S. olindensis*.

O sistema de solventes utilizado foi de MeOH/H₂O (pH 2,0, ácido fosfórico) em gradiente de polaridade, com fluxo de 1mL/min. O monitoramento foi feito por detector na região do ultravioleta (254nm) e as injeções foram de 10 µL.

3.2.6. Cromatografia líquida de alta eficiência - semi-preparativa (CLAE)

A amostra a ser fracionada foi dissolvida em MeOH/H₂O (pH 2,0, ácido fórmico) (80:20) na concentração de 10mg/mL e tratada em cartucho de extração em fase sólida de sílica de fase reversa C18 (Sep-Pak) para retirada de material graxo (Figura 13).

Figura 13: Procedimento utilizado na cromatografia líquida de alta eficiência (semi-preparativa) para o fracionamento do ppt-ret-M, extraído de *S. olindensis*.

O sistema de solventes utilizado foi de MeOH/H₂O (pH 2,0, ácido fórmico) em gradiente de polaridade, com fluxo de 4,6mL/min. O monitoramento foi feito por detector na região do ultravioleta (254nm) e as injeções foram de 500µL. Foram coletadas 6 frações (HP1 a HP6).

3.2.7. Cromatografia líquida de média pressão (CLMP)

A amostra a ser fracionada (500mg) foi dissolvida em MeOH (15mL) e injetada no sistema de CLMP (Figura 14).

Figura 14: Procedimento utilizado na cromatografia líquida de média pressão para o fracionamento do ppt-ret-M, extraído de *S. olindensis*.

O sistema de solventes utilizado foi de MeOH/H₂O (pH 2,0, ácido fórmico) em gradiente de polaridade, com fluxo de 16mL/min. O monitoramento foi feito por detector na região do ultravioleta (254nm). Foram coletadas 17 frações (M1 a M17).

3.3. Reações de hidrólise do complexo antibiótico

3.3.1. Hidrólise do precipitado

O ppt-ret-M (36mg) foi dissolvido em MeOH (3mL) em um balão de 50mL. Foi adicionado HCl 10 mol/L (1mL) e manteve-se o meio reacional sob refluxo a 80 °C por 2 horas (Figura 15).

Figura 15: Procedimento utilizado na hidrólise do complexo antibiótico a partir do precipitado “ppt-ret-M”.

O material hidrolisado foi neutralizado com NaOH 10 mol/L e extraído com AcOEt, seguido de lavagem com solução saturada de NaCl. O material resultante foi seco com Na₂SO₄, filtrado e evaporado, resultando as agliconas do complexo retamicina (18,5mg).

3.3.2. Hidrólise da suspensão celular

A suspensão celular do fermentador (1L) foi filtrada e transferida para um balão de 2L. O pH foi ajustado para 2,0 utilizando-se HCl 10 mol/L e manteve-se o meio reacional sob refluxo a 80 °C por 2 horas (Figura 16).

Figura 16: Procedimento utilizado na hidrólise do complexo antibiótico a partir da suspensão celular do fermentador.

O material hidrolisado foi neutralizado com NaOH 10 mol/L e extraído com AcOEt, seguido de lavagem com solução saturada de NaCl. O material resultante foi tratado com Na₂SO₄, filtrado e evaporado, resultando as agliconas do complexo retamicina (650mg).

3.4. Teste de atividade antimicrobiana (ICB-USP)

Para os testes de atividade biológica do complexo retamicina o microrganismos-teste, *B. subtilis* 007, foi cultivado em meio líquido YT (0,8% triptona, 0,5% extrato de levedura, 0,5% NaCl), até atingir uma densidade óptica de aproximadamente 0,5 nm. O plaqueamento destes microrganismos foi feito sobre o meio de cultura LB (1% triptona, 1% NaCl e 0,5% de extrato de levedura).

Sobre o tapete de células foram colocadas as amostras de antibióticos e incubados a temperatura ideal para o crescimento do microrganismo, durante 16 horas. Os resultados foram analisados de acordo com diâmetro do halo de inibição.

3.5. Material e equipamentos utilizados

Cultivo das células em reator: utilizou-se reator Biolafitte com capacidade útil de 10L, com eletrodo de pH (Mettler Toledo, modelo HA-465-50), eletrodo de oxigênio (Ingold-Mettler Toledo), controlador de temperatura (Biolafitte), fluxômetro de massa com controlador (Brooks Instr., modelo 5850E) e analisador de gases (New Brunswick Scientific, Co.).

Extração, purificação, partições por solventes e cromatografias: foram feitas utilizado-se solventes de grau P.A. (Merck e Synth). No caso de CLAE foram utilizados solventes de grau "HPLC" (EM Science / Merck).

Centrifugação: as células foram centrifugadas em centrífuga Hitachi, modelo CR 20B2, para o caldo do fermentador e em centrífuga Allegra 21 Series (Beckman Instruments, Inc., Califórnia, USA) para separação do precipitado purificado.

Nas técnicas cromatográficas CC, CCDP e CCDC foram utilizados:

- gel de sílica do tipo 60, partículas de 0,063-0,200 mm (Merck) para cromatografia em coluna (CC).
- gel de sílica do tipo 60 PF₂₅₄, partículas de 0,005-0,063 mm (Merck) em camadas de 1,0 mm de espessura sobre placas de vidro de 20 X 20 cm para cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP).
- cromatofolhas de alumínio de 20 X 20cm com camada de 0,25mm de gel de sílica do tipo 60 PF₂₅₄ (Merck).

Na separação por CCDRP (*Chromatotron*) foram utilizados:

- *Chromatotron*, Harrison Research, modelo 90E (Harrison Research, USA).
- Bomba peristáltica Lab Pump Jr., modelo RHSY (Fluid Metering Inc., Syosset, NY, USA).
- gel de sílica do tipo 60G PF₂₅₄, partículas de 0,005-0,063 mm (Merck) com gesso, em camada de 1,0 mm sobre placa circular de vidro para cromatografia em camada delgada radial preparativa (CCDRP).

Nas separações por CLAE foram utilizados:

- sistema de cromatografia ternário Shimadzu (Japan), modelo LC-10AD, com detetor UV/VIS modelo SPD-10A e injetor automático modelo SIL-10A, para condições analíticas e semi-preparativas.
- cartuchos de extração em fase sólida *Sep-Pak* (Waters Corp., Milford, Massachusetts, USA), de sílica de fase reversa C18.
- coluna de fase reversa LUNA C18, com partículas de 5µm de diâmetro, dimensões de 150 X 4,6mm e pré-coluna de 8,0 X 3,0mm (Phenomenex, USA), para CLAE-analítica.
- coluna de fase reversa LUNA C18, com partículas de 5µm de diâmetro, dimensões de 250 X 10,0mm e pré-coluna de 50 X 10mm (Phenomenex, USA), para CLAE-semi-preparativa.

Na separação por CLMP foram utilizados:

- sistema de cromatografia de média pressão binário Buchi (Switzerland), modelo B-688, com misturador para gradiente Buchi (Switzerland) modelo B-687 e detetor UV Knauer (Berlin) modelo K-2001.

- coluna empacotada com sílica de fase reversa com partículas de 0,055-0,100 mm (Waters Corp., Milford, Massachusetts, USA), dimensões de 230 X 36mm.

Medidas de UV / VIS: foram feitas em espectrofotômetro Hitachi (Hitachi Ltd., Japan), modelo U-2000, utilizando-se cubetas de quartzo de 1,0cm de caminho óptico.

Medidas de IV: foram feitas em espectrômetro de infra-vermelho FT-IR modelo MB-100 (Bomem, CA) em filme direto.

Espectrometria de massas com ionização por electrospray: os espectros foram obtidos por injeção direta da amostra por infusão (MeOH/H₂O, 1:1), em espectrômetro de massas modelo Platform II (Micromass, UK) dotado de analisador de massas quadrupolar, utilizando-se nitrogênio como gás de secagem e nebulização, temperatura na fonte de 70°C e tensões de 3.500V no capilar e 23V no cone.

Espectrometria de massas com ionização por impactação de elétrons: os espectros foram obtidos por inserção direta das amostras em espectrômetros de massas modelos:

- GCMS-QP5050A (Shimadzu, Japan) dotado de analisador de massas quadrupolar, com temperatura na sonda de inserção de 250°C e rampa de aquecimento de 30-275°C em 8 minutos, e energia de ionização de 70eV.

- 5988-A (Hewlett Packard, USA) dotado de analisador de massas quadrupolar, com temperatura na sonda de inserção de 250°C e rampa de aquecimento de 30-275°C em 5 minutos, e energia de ionização de 30eV.

Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear: os espectros de RMN- ^1H foram obtidos em espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker, modelo DRX-500 (500MHz), utilizando-se solventes deuterados Sigma-Aldrich com TMS como padrão interno na preparação das amostras.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Extração do complexo antibiótico

Com relação à extração do antibiótico a partir das células de *Streptomyces olindensis* DAUFPE 5622, os primeiros estudos descreveram que o complexo antibiótico extraído, na forma de um pó vermelho, apresentava-se depois de hidrolisado constituído por três substâncias mais abundantes que diferem entre si quanto a estrutura da aglicona. Estas três agliconas foram identificadas com sendo β -rodomicinona, γ -rodomicinona e aclavinona (Figura 17) e os açúcares ligados a elas antes da hidrólise foram identificados como sendo rodosamina, 2-desoxifucose e rodinose (Figura 18) (Lima *et al.*, 1969; Monache *et al.*, 1970). Outro estudo mais recente descreveu a presença de duas substâncias mais abundantes, com a mesma aglicona, diferindo quanto a um dos açúcares ligados a ela (Figura 2) (Bieber *et al.*, 1989).

Figura 17: Estruturas das agliconas identificadas após hidrólise do complexo antibiótico extraído de *S. olindensis* DAUFPE 5622.

Figura 18: Açúcares identificados após hidrólise do complexo antibiótico extraído de *S. olindensis* DAUFPE 5622.

O extrato metanólico das células de *S. olindensis* So20 foi submetido a um tratamento análogo ao descrito anteriormente, obtendo-se um precipitado. O espectro no UV / VIS deste complexo antibiótico obtido (Figura 19) apresenta máximos de absorção semelhantes aos encontrados na literatura para a linhagem DAUFPE 5622: 234, 254, 291, 493 e 535 nm, o que indica que as agliconas existentes neste complexo têm as mesmas características estruturais daquelas obtidas nos estudos anteriores com a linhagem selvagem (Lima *et al.*, 1969; Monache *et al.*, 1970).

Figura 19: Espectro na região do UV / VIS do complexo antibiótico extraído das células de *S. olindensis* So20.

As extrações efetuadas no decorrer deste trabalho, seguindo-se a literatura e modificadas na tentativa de se obter um material livre de impurezas, diferem um pouco dos dados citados conforme se pode observar nos cromatogramas obtidos por CLAE (Figura 20). Estes cromatogramas tornam evidente também a diferença qualitativa entre a composição dos complexos antibióticos extraídos das células da linhagem selvagem 5622 e da linhagem mutante So20.

Figura 20: Cromatogramas obtido por CLAE dos complexos antibióticos obtidos de *S. olindensis*.

Pode-se observar no cromatograma do complexo obtido das células mutantes dois picos intensos com tempos de retenção entre 11 e 12 minutos, os quais estão praticamente ausentes no cromatograma do complexo obtido da linhagem selvagem. Tais picos indicam que a linhagem mutante produz, pelo menos, duas substâncias de maior polaridade que não são produzidas pela linhagem selvagem. Pode-se observar também, ainda no cromatograma referente à linhagem mutante, dois picos nos tempos de retenção próximos a 25 e 26 minutos, os quais indicam a presença de 2 substâncias de menor polaridade produzidas pela linhagem mutante e inexistentes no complexo obtido da linhagem selvagem. No cromatograma da linhagem selvagem pode-se ainda observar que algumas substâncias, com tempos de retenção em aproximadamente 18, 22 e 24 minutos, aparecem com maior intensidade do que no cromatograma da linhagem mutante, indicando que se estas substâncias são as mesmas em ambas as linhagens elas diferem, então, em proporção.

Estes dados indicam diferenças que são de extrema importância no que diz respeito aos objetivos do programa de pesquisa no qual este estudo está inserido.

4.2. Fracionamentos por cromatografia e caracterizações espectroscópicas

As frações obtidas pelo fracionamento do complexo antibiótico por CC foram analisadas por CCDC, que indicou a presença de muitas substâncias, indicando que este método cromatográfico não resultou numa separação muito eficiente. Mesmo assim, algumas destas frações foram testadas quanto sua possível atividade antimicrobiana no ICB-USP (item 4.4).

O uso da técnica CCDP para purificação do complexo antibiótico mostrou uma boa resolução para a separação destas substâncias. Porém, não foi possível a recuperação das frações em quantidades suficientes para análises posteriores após a eluição, pois as mesmas ficaram retidas na fase estacionária e os vários solventes testados no momento da sua filtração e

lavagem não mostraram eficiência na recuperação das substâncias, comprometendo o rendimento por este método (Figura 21).

Figura 21: Separação do complexo antibiótico extraído de *S. olindensis* So20, por CCDP, visualizado na região do visível.

O método de fracionamento por CCDRP apresentou boa resolução quanto à separação das substâncias. Assim como no fracionamento por CCDP, este método também apresentou retenção do material aplicado na fase estacionária, mostrando-se também não muito eficaz na recuperação das frações. Porém, estas frações obtidas, mesmo em pouca quantidade, puderam ser analisadas por CLAE e três delas (FrR1-3, FrR1-8 e FrR1-11) foram selecionadas para maiores estudos.

Na fração de menor polaridade FrR1-3 pode-se observar por CLAE (Figura 22) a presença de duas substâncias majoritárias em $t_R=24,58\text{min}$ e $t_R=25,12\text{min}$. Por espectrometria de massas (ES+) por injeção direta, foram observados dois picos, em $\text{Da/e} = 452$ e 528 , correspondendo a íons $[\text{M}+\text{H}]^+$ de duas substâncias cujas massas moleculares foram determinadas como sendo 451Da e 527Da (Figura 23).

Figura 22: Cromatograma obtido por CLAE da fração FrR1-3.

No cromatograma da fração de polaridade intermediária FrR1-8 (Figura 24) observa-se a existência de uma substância principal em $t_R=10,60\text{min}$. Por espectrometria de massas (ES+), por injeção direta, foram observados dois picos, em $\text{Da/e} = 351$ e 701 , correspondendo a um íon $[\text{M}+2\text{H}]^+$ e um íon $[\text{M}+\text{H}]^+$ respectivamente. A análise detalhada destes picos e dos seus respectivos picos isotópicos indica que os mesmos se referem a uma única substância, cuja massa molecular foi determinada como sendo 700Da (Figura 25).

Figura 23: Espectro de massas (ES+) da fração FrR1-3.

Figura 24: Cromatograma obtido por CLAE da fração FrR1-8.

A fração de maior polaridade FrR1-11 apresentou em seu cromatograma (Figura 26) duas substâncias, sendo a de $t_R = 10,79\text{min}$ a mesma encontrada na fração FrR1-8 enquanto que, a de $t_R = 11,39\text{min}$, majoritária, foi observada como um pico não bem definido podendo conter mais de uma substância. Por espectrometria de massas (ES+) por injeção direta, foi observado um pico em $\text{Da/e} = 351$, correspondente ao íon $[\text{M}+2\text{H}]^+$ do mesmo componente principal da fração FrR1-8, de massa molecular determinada como sendo 700Da. Também foram observados mais três picos, em $\text{Da/e} = 494$, 522 e 550, correspondendo a íons $[\text{M}+\text{H}]^+$ de três substâncias cujas massas moleculares foram determinadas como sendo 493Da, 521Da e 549Da (Figura 27).

Devido à quantidade reduzida destas frações ao final do fracionamento, resultante da retenção das mesmas pela fase estacionária, não foi possível a obtenção de espectros de RMN de ^1H e ^{13}C para se efetuar a determinação estrutural das mesmas.

Figura25: Espectro de massas (ES+) da fração FrR1-8.

Figura 26: Cromatograma obtido por CLAE da fração FrR1-11.

A metodologia otimizada por CLAE para a análise dos complexos antibióticos extraídos das linhagens de *S. olindensis* mostrou-se adequada por apresentar uma boa resolução na separação das substâncias presentes nos complexos.

Pode-se observar nos cromatogramas das amostras ppt-ret-s e ppt-ret-m (Figura 20) uma apreciável diferença qualitativa entre a composição das mesmas.

Este método de separação poderá ser utilizado para uma futura quantificação das substâncias majoritárias existentes nos complexos antibióticos obtidos das células das linhagens selvagem e mutante de *S. olindensis*.

Figura 27: Espectro de massas (ES+) da fração FrR1-11.

Das 6 frações obtidas por CLAE (semi-preparativa), a fração HP3 apresentou em seu cromatograma (Figura 28) a presença de 2 substâncias majoritárias e apresentou também massa suficiente (3,8mg) para a obtenção de espectro de RMN-¹H.

Figura 28: Cromatograma obtido por CLAE da fração HP3.

O seu espectro de RMN-¹H (Figura 29, Tabela III) é semelhante aos espectros encontrados na literatura (Ando *et al.*, 1985; Bieber *et al.*, 1989; Li e Chen, 1986; Saito *et al.*, 1995) para o complexo retamicina (Figura 2).

Figura 29: Espectro de RMN- ^1H (500MHz) em CDCl_3 da fração HP3.

Tabela III: Principais deslocamentos químicos de RMN-¹H da fração HP3 (δ , 500MHz, CDCl₃)

Posição	δ (ppm)	J (Hz)
6', 14	1,06 – 1,07 m	
NMe	2,32 s	
6''	1,18 d	6,5
7a,b	2,89 m	
8, 13, 2', 2'', 3', 3''	1,55 – 2,10 m	
4'	3,86 sl	
4''	3,80 sl	
5''	4,13 q	6,5
5'	4,38 q	6,5
10	4,94 s	
3	7,31 dd	8,0 / 2,5
2	7,72 t	8,0
1	7,9 dd	8,0 / 2,5

Neste espectro (Figura 29) podem ser observados sinais dos hidrogênios da aglicona, característicos dos aromáticos, de H1 (δ 7,90, dd, $J=8,0/2,5$), H2 (δ 7,72, t, $J=8,0$) e H3 (δ 7,31, dd, $J=8,0/2,5$).

Os sinais dos hidrogênios H7a,b podem ser observados em δ 2,89 (m), os sinais dos hidrogênios H8 e H13 aparecem sobrepostos com os sinais dos hidrogênios dos açúcares, H2', H2'', H3' e H3'', em δ 1,55 - 2,10 (m), e o sinal do hidrogênio H14 aparece sobreposto com o hidrogênio do açúcar, H6', em δ 1,06 - 1,07 (m).

O hidrogênio ligado ao carbono onde se dá a ligação com a rodosamina, H10, apresenta-se como um sinal em δ 4,94 (s). Em δ 2,32 observa-se um singleto referente as duas metilas ligadas ao nitrogênio da rodosamina.

Os sinais dos hidrogênios carbinólicos dos açúcares, H4' e H4'', aparecem como singletos largos respectivamente em δ 3,86 e δ 3,80.

Os hidrogênios H5' e H5'' apresentam, respectivamente, sinais em δ 4,38 e δ 4,13 na forma de quartetos, ambos com $J=6,5$ e a metila H6'' apresenta um sinal em δ 1,18 (d) com $J=6,5$.

Analisando-se os sinais dos hidrogênios observados neste espectro, e considerando-se que esta fração contém ao menos duas substâncias, pode-se esperar que elas sejam análogas à retamicina e também análogas entre si, com a mesma aglicona mas com diferentes números de açúcares ligados (Figura 30).

Figura 30: Possíveis constituintes da fração HP3.

No espectro na região do IV (Figura 31) pode-se observar em 3394 cm^{-1} uma banda larga e forte que indica a existência de hidroxilas fenólicas. Em 2919 cm^{-1} observa-se uma banda média e alargada que em conjunto com uma banda aguda e forte em 1594 cm^{-1} indica a existência de carbonilas queladas. Estes sinais são concordantes com as substituições propostas para os carbonos 4, 6, 11, 5 e 12 das substâncias I e II (Figura 30).

Figura 31: Espectro no IV da fração HP3.

No espectro de massas com ionização por impacto de elétrons (Figura 32) pode-se observar um pico em $\text{Da/e} = 352$ correspondente a um íon fragmentário, de massa molecular determinada como sendo 352Da, referente à aglicona proposta na Figura 30. Um pico em $\text{Da/e} = 334$ correspondente a um íon fragmentário de massa molecular determinada como sendo 334Da pode ser atribuído à mesma aglicona, após a perda de uma molécula de água, provavelmente em C9-C10. Estes dados também colaboram para a determinação estrutural da aglicona proposta para as substâncias I e II, mostradas na Figura 30.

Por espectrometria de massas (ES+) por injeção direta, foram observados dois picos, em $\text{Da/e} = 528$ e 658 , correspondendo a íons $[\text{M}+\text{H}]^+$ de duas substâncias, cujas massas moleculares foram determinadas como sendo 527Da e 657Da (Figura 33). Estas massas moleculares são coerentes para as substâncias propostas mostradas na Figura 30 (estruturas I e II respectivamente), análogas ao complexo retamicina, diferindo quanto ao número de açúcares ligados à aglicona (Angelis e Nicoletti, 1989).

Devido a pouca quantidade de massa desta fração não foi possível a obtenção de espectros de RMN de ^{13}C para a confirmação das estruturas destas substâncias.

Figura 32: Espectro de massas (IE, 70eV) da fração HP3.

Figura 33: Espectro de massas (ES+) da fração HP3.

As 17 frações obtidas por CLMP foram analisadas por CLAE para a avaliação de suas purezas. Somente as frações M1, M7 e M9 foram selecionadas para maiores estudos, devido as quantidades coletadas e aos seus perfis cromatográficos, os quais indicaram uma menor quantidade de substâncias em cada uma.

A fração de maior polaridade M1 apresentou em seu cromatograma (Figura 34) uma substância majoritária em $t_R = 11,55\text{min}$ como um pico não bem definido, podendo conter mais de uma substância.

Figura 34: Cromatograma obtido por CLAE da fração M1.

No seu espectro de RMN- ^1H (Figura 35) pode-se observar diferenças principalmente na região de 7,2 a 8,2 ppm, com relação ao espectro de RMN- ^1H (Figura 29) da fração HP3, indicando a presença de uma aglicona diferente para M1, ou seja, com substituintes diferentes em C1, C2 e C3 das agliconas das substâncias presentes na fração HP3. Também não se observa para M1 o sinal na região de 2,32 ppm (s), referente as duas metilas ligadas ao nitrogênio como na rodosamina. Sendo assim, pode-se afirmar que a fração M1 não contém rodosamina dentre os seus açúcares.

Figura 35: Espectro de RMN- ^1H (500MHz) em MeOD da fração M1.

No espectro na região do UV / VIS (Figura 36) da fração M1 pode-se observar os máximos de absorção em 495 e 529 nm semelhantes aos observados no espectro no UV do complexo antibiótico (Figura 19), sendo que a fração M1 apresenta um máximo de absorção em 582 nm, provavelmente devido à presença de mais substituintes com oxigênio ligados a anel aromático.

Figura 36: Espectro no UV / VIS da fração M1.

No espectro na região do IV (Figura 37) da fração M1 pode-se observar em 3405 cm^{-1} uma banda larga e forte que indica a existência de hidroxilas fenólicas. Em 2936 cm^{-1} observa-se uma banda média e alargada que, em conjunto com uma banda aguda e forte em 1601 cm^{-1} , indica a existência de carbonilas queladas. Em 1666 cm^{-1} observa-se uma banda aguda e forte que indica a existência de outro tipo de carbonila.

Estes dados coadunam para o fato das agliconas destas substâncias apresentarem diferenças com relação as que foram propostas para as substâncias presentes na fração HP3.

O espectro de massas (IE) (Figura 38) não apresenta picos que possam ser atribuídos a íons fragmentários das agliconas, pois todos aqueles presentes são relativos a fragmentos de massa molecular inferior a 180Da. Este fato indica que as agliconas presentes nesta fração são mais lábeis e sensíveis do que as presentes em HP3, não sendo possível definir a estrutura destas.

Figura 37: Espectro no IV da fração M1.

Figura 38: Espectro de massas (IE, 30eV) da fração M1.

Esta fração foi analisada por espectrometria de massas (ES+) por injeção direta, sendo possível observar três picos, em $Da/e = 351, 416$ e 481 , que pela análise detalhada dos seus picos isotópicos, são correspondentes a íons $[M+2H]^+$ de três substâncias cujas massas moleculares foram determinadas como sendo $700Da, 830Da$ e $960Da$ (Figura 39). Também foi observado um pico em $Da/e = 701$, referente ao íon $[M+H]^+$ da mesma substância de massa molecular determinada como sendo $700Da$. Estes dados indicam que as substâncias presentes em M1 podem conter mais unidades de açúcar, de massa molecular $130Da$, do que as substâncias presentes nas outras frações analisadas.

As frações M7 e M9 foram analisadas por CLAE (Figuras 40 e 41, respectivamente) e constatou-se a presença das mesmas substâncias, porém, em quantidades diferentes em $t_R=24,39min$, $t_R=25,14min$, $t_R=27,09min$, $t_R=30,84min$, e $t_R=31,44min$. Nos espectros de massas (ES+) por injeção direta das frações M7 e M9 (Figuras 42 e 43, respectivamente), foram observados vários picos correspondentes a íons $[M+H]^+$ de várias substâncias cujas massas moleculares foram determinadas como sendo $527, 641, 657, 673, 755, 771, 787Da$. Estas massas moleculares são análogas às massas moleculares da retamicina E1 e E2 (Figura 2) e também a substâncias análogas à retamicina, com diferenças quanto ao número de açúcares ligados à aglicona. Algumas destas substâncias análogas podem ser semelhantes às encontradas na fração HP3 (Figura 30).

Figura 39: Espectro de massas (ES+) da fração M1.

Figura 40: Cromatograma obtido por CLAE da fração M7.

Figura 41: Cromatograma obtido por CLAE da fração M9.

Figura 42: Espectro de massas (ES+) da fração M7.

Figura 43: Espectro de massas (ES+) da fração M9.

O cromatograma obtido por CLAE da fração M4 (Figura 44) torna evidente a quantidade de constituintes presentes no complexo antibiótico extraído de *S. olindensis*, uma vez que se observa uma quantidade muito grande de picos, encontrados em apenas uma fração de polaridade média do complexo antibiótico. Esta fração, assim como algumas outras, não foram submetidas a estudos posteriores devido a esta grande complexidade.

Figura 44: Cromatograma obtido por CLAE da fração M4.

4.3. Reações de hidrólise do complexo antibiótico

As hidrólises ácidas efetuadas para o complexo obtido das células e para o meio líquido obtido do fermentador foram realizadas com o objetivo de investigar a natureza estrutural das agliconas.

Na CCDC do complexo antibiótico, antes e depois da hidrólise, observa-se uma banda relativa ao complexo antibiótico que, no material não hidrolisado apresenta $R_f=0,01$ e, após a hidrólise ácida, a mesma foi decomposta em diversas bandas com R_f de 0,09 a 0,56. Estas bandas de menor polaridade indicam a existência de diversas agliconas de polaridades próximas, que constituem o complexo. Sendo assim, pode-se afirmar que o complexo obtido das células da linhagem So20 de *S. olindensis* contém substâncias análogas, que diferem entre si também quanto à aglicona.

Os espectros na região do UV / VIS do material antes e depois da hidrólise (Figura 45), indicam que as estruturas das agliconas não foram afetadas, podendo-se observar máximos de absorção quase idênticos para o complexo antes da hidrólise e para o ppt-ret-M hidrolisado obtido das células de *S. olindensis* (Figura 45A e 45B, respectivamente), em: 234, 254, 291, 493 e 535 nm. Para o meio de cultura hidrolisado pode-se observar no seu espectro na região do UV / VIS (Figura 45C) uma grande semelhança nos máximos de absorção em 493 e 535 nm em relação ao material antes da hidrólise (Figura 45A). Não é possível se observar os máximos de absorção em 234, 254 e 291 nm para o meio de cultura hidrolisado devido à grande quantidade de substâncias presentes neste material que interferem na absorção nesta região.

Figura 45: Espectros no UV / VIS do complexo antibiótico antes e depois das reações de hidrólise (A = complexo antes da hidrólise; B = ppt-ret-M hidrolisado; C = meio de cultura hidrolisado).

4.4. Testes de atividade biológica (ICB-USP)

4.4.1. Teste de atividade antimicrobiana

As frações obtidas por CC foram avaliadas quanto a sua atividade antimicrobiana em *Bacillus subtilis* 007 no ICB-USP e para duas delas (FrC2-6 e FrC2-7) foram observadas atividades neste teste (Tabela IV).

Tabela IV - Teste de atividade antimicrobiana das frações purificadas por cromatografia em coluna do complexo retamicina em *B. subtilis* 007 (fração testada X diâmetro do halo de inibição)

FrC2-1	FrC2-2	FrC2-3	FrC2-4	FrC2-5	FrC2-6	FrC2-7	FrC2-8
-	-	12 mm	11,5 mm	14,5 mm	19,5 mm	16 mm	14 mm

4.4.2. Teste de intercalação do antibiótico em fragmentos de DNA em gel de eletroforese “shift”

Algumas frações obtidas por CCDP, CCDRP, CLAE (semi-preparativa) e CLMP foram avaliadas quanto a sua capacidade de intercalação em fragmento de DNA (pEt23 - 3,7 Kb) no ICB-USP e algumas delas se mostraram ativas neste teste.

Este ensaio, para visualização do efeito do antibiótico no DNA, consiste na mistura do DNA do plasmídio com diferentes concentrações de antibióticos, tais como: retamicina, algumas frações purificadas do complexo antibiótico extraído de *S. olindensis* e doxorrubicina (utilizada como padrão).

Observa-se na Figura 46 um deslocamento de até 50 pb quando utilizado 100 ng da fração FrR1-3. Já nas Figuras 47 e 48, as frações FrR1-8 e FrP1-9 apresentam um deslocamento de 100 pb. Destaca-se o efeito “shift” da fração FrR1-8 onde uma quantidade de 10 ng foi suficiente para provocar o deslocamento do DNA, enquanto que foram necessários 80 ng da fração FrP1-9 para obter o mesmo efeito. Na Figura 49 se observa o deslocamento de até 300 pb para a fração HP1, mostrando que ela tem uma capacidade de intercalação no DNA maior do que a das outras frações testadas.

Figura 46: Gel de eletroforese do teste de intercalação da fração FrR1-3 (diferentes concentrações) no fragmento de DNA. (a- Ladder 1 Kb, 1- controle sem antibiótico, 2- 10ng, 3- 20ng, 4- 30ng, 5- 40ng, 6- 50ng, 7- 60ng, 8- 70ng, 9- 80ng, 10- 90ng, 11- 100ng, 12- controle sem antibiótico, b- Ladder 1 Kb).

Figura 47: Gel de eletroforese do teste de intercalação da fração FrR1-8 (diferentes concentrações) no fragmento de DNA. (a- Ladder 1 Kb, 1- controle sem antibiótico, 2- 10ng, 3- 20ng, 4- 30ng, 5- 40ng, 6- 50ng, 7- 60ng, 8- 70ng, 9- 80ng, 10- 90ng, 11- 100ng, 12- controle sem antibiótico, b- Ladder 1 Kb).

Figura 48: Gel de eletroforese do teste de intercalação da fração FrP1-9 (diferentes concentrações) no fragmento de DNA. (a- Ladder 1 Kb, 1- controle sem antibiótico, 2- 10ng, 3- 20ng, 4- 30ng, 5- 40ng, 6- 50ng, 7- 60ng, 8- 70ng, 9- 80ng, 10- 90ng, 11- 100ng, 12- controle sem antibiótico).

Figura 49: Gel de eletroforese do teste de intercalação das frações obtidas por CLAE no fragmento de DNA (a- padrão de peso molecular Ladder 1Kb; 1- controle sem sobrenadante; 2- HP1 1ng; 3- HP1 5ng; 4- HP1 10ng; 5- HP3 1ng; 6- HP3 5ng; 7- HP3 10ng; 8- HP4 1ng; 9- HP4 5ng; 10- HP4 10ng; 11- HP5 1ng; 12- HP5 5ng; 13- HP5 10ng; 14- controle sem sobrenadante; b- padrão Ladder).

A fração M1 (Figura 50) provocou um deslocamento de 100 pb quando utilizada uma quantidade de 10 ng, sendo este efeito semelhante ao da fração FrR1-8, e um deslocamento de até 300 pb quando utilizada uma quantidade de 30ng.

Figura 50: Gel de eletroforese do teste de intercalação da fração M1 (diferentes concentrações) no fragmento de DNA. (a- Ladder 1 Kb, 1- controle sem antibiótico, 2- 5ng, 3- 10ng, 4- 15ng, 5- 20ng, 6- 25ng, 7- 30ng, 8- 40ng, 9- 50ng, 10- 60ng, 11- 70ng, 12- 80ng, 13- controle sem antibiótico).

5.

CONCLUSÕES

- A análise dos extratos obtidos das linhagens selvagem e mutante de *S. olindensis* através de CLAE mostraram diferenças qualitativas entre si, indicando que a mutação genética processada na linhagem selvagem alterou sua produção de metabólitos secundários;

- As técnicas cromatográficas analíticas, especialmente a CLAE, resultaram em excelente separação das substâncias existentes no complexo antibiótico extraído, indicando sua potencialidade como método quantitativo das substâncias de maior interesse. Porém, em escala semi-preparativa, as técnicas empregadas não se mostraram muito eficientes quanto à recuperação total do material aplicado;

- As reações de hidrólise ácida e as análises dos produtos formados, por CCDC, indicaram a presença de várias agliconas de polaridades próximas, indicando que este complexo extraído da linhagem mutante contém mais de três substâncias de estrutura antraciclínica, diferente dos dados da literatura para a linhagem selvagem;

- Algumas frações contendo antraciclinas apresentaram atividade bactericida contra *Bacillus subtilis* 007 e também capacidade pronunciada de intercalação no DNA, que indica serem promissoras fontes de estudos na obtenção de novos fármacos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ando, T., Hirayama, K., Takahashi, R., Horino, I., Etoh, Y., Morioka, H., Shibai, H., Murai, A. (1985). The structures of anthracycline antibiotics, Cosmomycins A and B. *Agric. Biol. Chem.* **49** (4): 1207-1209.

Angelis, F. D., Nicoletti, R. (1989). The antibiotic complex of retamycins: A fast atom bombardment mass spectrometric study. *Biomedical and Environmental Mass Spectrometry*. **18**: 553-557.

Aviles, A., Neri, N., Cuadra, I., Alvarado, I., Cleto, S. (2000). Second lethal events associated with treatment for Hodgkin's disease: A review of 2980 patients treated in a single Mexican institute. *Leukemia & Lymphoma* **39**: 311-319.

Bakina, E., Wu, Z., Rosenblum, M., Farquhar, D. (1997). Intensely cytotoxic anthracycline prodrugs: Glucuronides. *Journal of Medicinal Chemistry*. **40** (25): 4013-4018.

Bieber, L. W., Silva Filho, A. A., Silva, E. C., Mello, J. F., Lyra, F. D. A. (1989). The anthracycline complex retamycin, 1. structure determination of the major constituents. *Journal of Natural Products*. **52** (2): 385-388.

Brockmann, H., Bauer, K. (1950). Rhodomycin, ein rotes antibiotikum aus actinomyceten. *Naturwissenschaften*. **37** (21): 492-493.

Chaires, J. B., Leng, F., Przewloka, T., Fokt, I., Ling, Y., Perez-Soler, R., Priebe, W. (1997). Structure-based design of a new bisintercalating anthracycline antibiotic. *Journal of Medicinal Chemistry*. **40** (3): 261-266.

- Dewick, P. M. (1997). The acetate pathway: Fatty acids and polyketides. In: "Medicinal Natural Products". (eds) John Wiley & Sons, Chichester, England. pp. 32-108.
- Di Marco, H., Silverstrini, R., Gaetani, M., Soldati, M., Orezzi, P., Dastia, T., Scarpinato, B. M., Valentini, L. (1964). Daunomycin new antibiotic of rhodomycin group. *Nature*. **201** (492): 706.
- Fenick, D. J., Taatjes, D. J., Koch, T. H. (1997). Doxoform and daunoform: Anthracycline-formaldehyde conjugates toxic to resistant tumor cells. *Journal of Medicinal Chemistry*. **40** (16): 2452-2461.
- Florent, J., Dong, X., Gaudel, G., Mitaku, S., Monneret, C., Gesson, J., Jacquesy, J., Mondon, M., Renoux, B., Andrianomenjanahary, S., Michel, S., Koch, M., Tillequin, F., Gerken, M., Czech, J., Straub, R., Bosslet, K. (1998). Prodrugs of anthracyclines for use in antibody-directed enzyme prodrug therapy. *Journal of Medicinal Chemistry*. **41** (19): 3572-3581.
- Fujii, I., Ebizuka, Y. (1997). Anthracycline biosynthesis in *Streptomyces galilaeus*. *Chemical Reviews*. **97** (7): 2511-2523.
- Furlan, R. L. A. (1997). Obtenção e Estudo de Mutantes com Produção Alterada do Antibiótico Retamicina Sintetizado por *Streptomyces olindensis* DAUFPE 5622. "Dissertação de Mestrado" - ICB-USP.
- Hopwood, D. A., Sherman, D. H. (1990). Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Annu. Rev. Genet.* **24**: 37-66.
- Horenstein, M. S., Vander Heider, R. S., L'Ecuyer, T. J. (2000). Molecular basis of anthracycline-induced cardiotoxicity and its prevention. *Molecular Genetics and Metabolism*. **71** (1-2): 436-444.

- Hutchinson, C. R., Fujii, I. (1995). Polyketide synthase gene manipulation: A structure-function approach in engineering novel antibiotics. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**: 201-238.
- Hutchinson, C. R., Colombo, A. L. (1999). Genetic engineering of doxorubicin production in *Streptomyces peucetius*: a review. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology.* **23** (1): 647-652.
- Iarussi, D., Indolfi, P., Galderisi, M., Bossone, E. (2000). Cardiac toxicity after anthracycline chemotherapy in childhood. *HERZ.* **25** (7): 676-688.
- Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F., Hopwood, D. A. (2000). General introduction to actinomycete biology. In: "Practical *Streptomyces* Genetics". (eds) John Innes Centre, Norwich Research Park, Colney, Norwich NR4 7UH, England. pp. 1-42.
- Kunnari, T. J., Ylihonko, K. P. J., Klika K. D., Mantsala, P. I., Hakala, J. M. L. (2000). Hybrid anthracyclines from a genetically engineered *Streptomyces galilaeus* mutant. *Journal of Organic Chemistry.* **65** (10): 2851-2855.
- Li, M., Chen, Y. (1986). Structural studies on rhodilunancins A and B. *The Journal of Antibiotics.* **39** (3): 430-436.
- Lima, O. G., Lyra, F. D. A., Albuquerque, M. M. F., Maciel, G. M., Coelho, J. S. B. (1969). Primeiras observações sobre o complexo antibiótico e antitumoral - Retamicina - produzido pelo *Streptomyces olindensis* nov. sp. IAUFPe. *Revista do Instituto de Antibióticos.* **9**: 27-37.
- Meinardi, M. T., van der Graaf, W. T. A., van Veldhuisen, D. J., Gietema, J. A., de Vries, E. G. E., Sleijfer, D. T. (1999). Detection of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Cancer Treatment Reviews.* **25** (4): 237-247.

- Minotti, G., Licata, S., Saponiero, A., Menna, P., Calafiore, A. M., Giammarco, G. D., Liberi, G., Animati, F., Cipollone, A., Manzini, S., Maggi, C. A. (2000). Anthracycline metabolism and toxicity in human myocardium: Comparisons between doxorubicin, epirubicin, and a novel disaccharide analogue with a reduced level of formation and [4Fe-4S] reactivity of its secondary alcohol metabolite. *Chem. Res. Toxicol.* **13** (12): 1336-1341.
- Miyamoto, Y., Oyabu, T., Johdo, O., Nagamatsu, Y., Yoshimoto, A. (1998). Isolation and identification of a common intermediate produced by blocked mutants from beta-rhodomyacin and daunomycin producers. *Journal of Fermentation and Bioengineering.* **86** (6): 611-613.
- Monache, F. D., Marini-Bettòlo, G. B., Albuquerque, I. L., Lyra, F. D. A., Lima, O. G. (1970). Sulla composizione della retamicina, un complesso antibiotico ad attività antitumorale prodotto da *Streptomyces olindensis* nov. sp. (IAUFPe 5622). *Ann. Ist. Super. Sanità.* **6**: 357-364.
- Nabholtz, J. M., Mackey, J. R., Smylie, M., Paterson, A., Noel, D. R., Al-Tweigeri, T., Tonkin, K., North, S., Azli, N., Riva, A. (2001). Phase II study of docetaxel, doxorubicin, and cyclophosphamide as first-line chemotherapy for metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology.* **19** (2): 314-321.
- Oeffinger, K. C., Eshelman, D. A., Tomlinson, G. E., Tolle, M., Schneider, G. W. (2000). Providing primary care for long-term survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Family Practice.* **49** (12): 1133-1146.
- Ogawa, M. (1999). Novel anticancer drugs in Japan. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology.* **125** (3-4): 134-140.
- Pratesi, G., Monestiroli, S. V. (2001). Preclinical evaluation of new anthracyclines. *Current Medicinal Chemistry.* **8** (1): 9-13.

- Saito, S., Katsuda, Y., Johdo, O., Yoshimoto, A. (1995). New rhodomycin analogs, SS-288A and SS-288B, produced by a *Streptomyces violaceus* A262 mutant. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59** (1): 135-137.
- Salminen, E., Bergman, M., Huhtala, S., Jekunen, A., Ekholm, E. (2000). Docetaxel, a promising novel chemotherapeutic agent in advanced breast cancer. *Anticancer Research.* **20** (5C): 3663-3668.
- Strohl, W. R., Dickens M. L., Rajgarhia, V. B., Woo, A. J., Priestley, N. D. (1999). Biotechnology of Antibiotics In: *Drugs and the Pharmaceutical Sciences.* **82**: 577-657.
- Takagi, Y., Nakai, K., Tsuchiya, T., Takeuchi, T. (1996). A 5'-(Trifluoromethyl)anthracycline glycoside: Synthesis of antitumor-active 7-O-(2,6-Dideoxy-6,6,6-trifluoro- α -L-lyxo-hexopyranosyl)adriamycinone. *Journal of Medicinal Chemistry.* **39** (8): 1582-1588.
- Zambetti, M., Moliterni, A., Materazzo, C., Stefanelli, M., Cipriani, S., Valagussa, P., Bonadonna, G., Gianni, L. (2001). Long-term cardiac sequelae in operable breast cancer patients given adjuvant chemotherapy with or without doxorubicin and breast irradiation. *Journal of Clinical Oncology.* **19** (1): 37-43.