UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**“Influência das condições de cultivo de duas linhagens
Streptomyces no perfil químico e atividade citotóxica”**

Noemi Jacques Vieira

Ribeirão Preto

2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**“Influência das condições de cultivo de duas linhagens
Streptomyces no perfil químico e atividade citotóxica”**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para a obtenção do título de
Mestre em Ciências : Área de Concentração
Produtos Naturais e Sintéticos.**

Orientada: Noemi Jacques Vieira

Orientadora: Prof. Dra Mônica Tallarico Pupo

Ribeirão Preto

2011

Ficha Catalográfica

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Vieira, Noemi Jacques

“Influência das condições de cultivo de duas linhagens *Streptomyces* no perfil químico e atividade citotóxica”

100p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências

Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração:

Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Pupo, Monica Tallarico.

1. *Streptomyces* sp. 2. Condições de Cultivo 3. Atividade citotóxica

Autor: Noemi Jacques Vieira

Título: “Influência das condições de cultivo de duas linhagens *Streptomyces* no perfil químico e atividade citotóxica”

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais
e Sintéticos.

Orientador(a): Prof.Dra. Monica Tallarico
Pupo.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

**O presente trabalho foi realizado sobre orientação da Professora Dra.
Mônica Tallarico Pupo**

Laboratório de Química Farmacêutica

Dedico este trabalho,

Aos meus pais Dirmar e Maria Verônica que sempre me incentivaram ao caminho da busca pelo conhecimento e aprimoramento. Muito obrigada por me ensinarem a amar, se dedicar ao trabalho e nunca desistir dos sonhos.

Agradecimentos

À Prof Dra. Mônica Tallarico Pupo pelos ensinamentos de Química, vivência laboratorial, amizade e dedicação aos alunos.

Agradeço a amiga Cláudia pelo companheirismo e auxílio no laboratório.

Agradeço em especial aos meus amigos do laboratório Raphael, Larissa, Fernanda, Marília, Adriana, Rita, Márcio, Warley e Denise.

Agradeço em especial a Fernanda e a Denise pelos ensinamentos das técnicas de HPLC.

Agradeço aos professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto pelos ensinamentos.

Aos amigos do laboratório de Farmacognosia.

A minha amiga Rafaela Sales pelo companheirismo e amizade.

Agradeço a Deus por sempre estar ao meu lado ajudando a passar pelas dificuldades e iluminando meu caminho.

Agradecimentos à Fapesp pela bolsa concedida durante o período do mestrado.

Sumário	i
Lista de tabelas	iv
Lista de figuras	v
Resumo	x
Abstract	xi
1) Introdução	1
1.1) Actinobactérias como fontes de metabólitos secundários e fármacos	2
1.2) Actinobactérias de sedimentos marinhos e produção de metabólitos secundários	6
1.3) Actinobactérias e a produção de compostos bioativos	10
1.4) Ecossistema manguezal e hospedeiro <i>Ucides cordatus</i>	11
2) Objetivos	13
3) Materiais e Métodos	15
3.1) Equipamentos e condições de uso	16
3.2) Ensaio biológico de citotoxicidade em células tumorais	17
3.3) Métodos	18
3.3.1) Reativação e conservação das linhagens dos micro-organismos	18
3.3.2) Sequenciamento genético das linhagens <i>Streptomyces</i> sp. Act1 e <i>Streptomyces</i> sp. Act2	19
3.3.3) Cultivos	19
3.3.3.1) Cultivo em meio semi-sólido ISP-2	19
Experimento de antagonismo para análise de halo de inibição	
3.3.3.2) Experimento cultivo em meio líquido (ISP-2) <i>Streptomyces</i> sp	21

Act1 e *Streptomyces* sp Act 2

3.3.3.3) Experimento de avaliação da produção de metabólitos em 23
função do tempo

3.3.3.4) Cultivo em meio sólido de arroz 25

3.3.3.5) Cultivo em meio sólido de arroz com água do mar 26

3.3.3.6) Experimento de cultivo líquido água do mar linhagem 28
Streptomyces sp. Act2

3.3.4) Fracionamento e Análise dos extratos 29

3.3.4.1) Fracionamento e análises dos extratos obtidos do cultivo em 29
meio semi-sólido ISP-2 experimento halo de inibição

3.3.4.2) Fracionamento e análises dos extratos do experimento de 30
avaliação produção de metabólitos em função do tempo

3.3.4.3) Fracionamento e análises dos extratos e frações obtidas do 31
experimento de cultivo líquido em meio ISP- 2 das linhagens
Streptomyces sp. Act 1 e *Streptomyces* sp. Act 2

3.3.4.4) Fracionamento e análises dos extratos e frações obtidas do 32
experimento de cultivo sólido em meio de arroz da linhagem
Streptomyces sp Act1

3.3.4.5) Fracionamento e análises dos extratos e frações obtidas 33
doexperimento de cultivo sólido em meio de arroz da linhagem
Streptomyces sp Act2

3.3.4.6) Fracionamento e análises dos extratos e frações obtidas 36
doexperimento de cultivo sólido em meio de arroz com água do mar da
linhagem *Streptomyces* sp Act1

3.3.4.7) Fracionamento e análises dos extratos e frações obtidas 36
doexperimento de cultivo sólido em meio de arroz com água do mar da
linhagem *Streptomyces* sp Act2

3.3.4.8) Fracionamento e análises dos extratos e frações obtidas 37
doexperimento de cultivo líquido em meio de arroz com água do mar da
linhagem *Streptomyces* sp Act2

3.3.5) Atividade Citotóxica em Células tumorais 38

3.3.5.1) Experimento do cultivo em meio semi-sólido ISP-2 experimento halo de inibição	38
3.3.5.2) Experimento cultivo em meio sólido de arroz	38
3.3.5.3) Experimento cultivo em meio sólido e em meio líquido com água do mar.	38
4) Resultados e Discussão	39
4.1) Sequenciamento genético das linhagens Act1 e Act2	40
4.2) Cultivo em meio semi-sólido ISP-2	40
Experimento de antagonismo para análise de halo de inibição	
4.3) Análises cromatográficas dos extratos provenientes do cultivo em meio semi-sólido ISP-2. Experimento de antagonismo para análise de halo de inibição	42
4.4) Experimento cultivo em meio líquido ISP-2.	49
4.5) Experimento de avaliação da produção de metabólitos em função do tempo	51
4.6) Cultivo em meio sólido de arroz	53
4.7) Cultivo em meio sólido de arroz com água do mar	61
4.8) Experimento de cultivo sólido com água do mar da linhagem <i>Streptomyces</i> sp. Act1	62
4.9) Experimento de cultivo sólido com água do mar da linhagem <i>Streptomyces</i> sp. Act2	71
4.10) Cultivo líquido Act2 com água do mar	77
4.11) Experimento de cultivo líquido com água do mar da linhagem <i>Streptomyces</i> sp. Act2	78
4.12) Ensaio de Citotoxicidade em células tumorais	87
5) Conclusões	92
6) Referências	97

Lista de Tabelas

Tabela 1. Novos metabólitos produzidos por actinobactérias marinhas durante o período de 2003 à 2005. Adaptada de (LAM, 2006).	7
Tabela 2. Redimento em miligramas (mg) do experimento halo de inibição.	41
Tabela 3. Massa das frações Sephadex LH-20 obtidas após fracionamento do extrato de Halo solúvel em álcool metílico.	45
Tabela 4. Redimento em miligramas do experimento de cultivo líquido.	51
Tabela 5. Rendimento em miligramas das amostras obtidas no experimento de avaliação da produção de metabólitos em função do tempo.	53
Tabela 6. Rendimentos em massa (miligramas) dos cultivos em meio sólido para as linhagens <i>Streptomyces</i> sp. Act1, <i>Streptomyces</i> sp. Act2 e branco.	54
Tabela 7. Rendimento em massa (miligramas) das frações obtidas após a separação em Resina Sephadex LH-20.	56
Tabela 8. Rendimentos em massa (mg) das frações obtidas após a separação em resina Sephadex LH-20.	60
Tabela 9. Rendimentos em massa (gramas) experimento cultivo sólido com água do mar.	62
Tabela 10. Rendimentos em massa (mg) experimento cultivo sólido com água do mar Act1- Sephadex LH20	62
Tabela 11. Rendimentos em massa (mg) experimento cultivo sólido com água do mar Act1- XAD-16.	64
Tabela 12. Massa em mg das frações isoladas de XAD-16. Cultivo sólido água do mar da linhagem <i>Streptomyces</i> sp. Act1.	67
Tabela 13. Rendimentos em massa (mg) do experimento cultivo sólido com água do mar Act2- Sephadex LH20	72
Tabela 14. Rendimentos em massa (mg) experimento cultivo sólido com água do mar <i>Streptomyces</i> sp. Act2- XAD-16.	74
Tabela 15. Rendimentos em mg das amostras obtidas após partição do extrato bruto líquido Act2 mar e dos brancos do experimento após	78

partição.

Tabela 16. Rendimentos em massa (mg) fracionamento da fração acetato de etila proveniente do cultivo de Act2 com água do mar. 82

Tabela 17. Rendimentos em massa (mg) fracionamento da fração butanol proveniente do cultivo de Act2 com água do mar. 83

Tabela 18. Rendimentos em massa (mg) fracionamento com coluna de sílica flash da fração butanol do cultivo líquido com água do mar da linhagem *Streptomyces* sp. Act2 cultivo com água do mar. 87

Tabela 19. Resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade. 88

Tabela 20. Resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade 89

Tabela 21. Resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade. 90

Lista de Figuras

Figura 1) Distribuição dos fármacos inovativos derivados de produtos naturais (adaptado de GANESAN, 2008). 3

Figura 2) Alguns antibióticos, de uso clínico como antibacterianos, isolados de espécies de *Streptomyces* (dalbavacina é um derivado semi-sintético em fase de registro). 4

Figura 3) Alguns antibióticos antitumorais de uso clínico isolados de espécies de *Streptomyces*. 5

Figura 4) Metabólitos secundários isolados de *Salinospora tropica* 7

Figura 5) Cianospirasideos A e B isolados de *Salinospora pacifica*. 8
Marinopirróis isolados de *Streptomyces* sp., micro-organismos obrigatoriamente marinhos.

Figura 6) Distribuição percentual representativa das classes de compostos antitumorais isolados de actinobactérias marinhas. Adaptado de (OLANO, et al., 2009). 9

Figura 7) Peptídeos cíclicos isolados de *Streptomyces* sp. marinhos. 1) 11
Ciclomarina A, 2) Modificação estrutural na posição 49 resulta no composto Ciclomarina B, 3) Modificação estrutural na posição 2 e 3 resulta na Ciclomarina C.

Figura 8) Experimento antagonismo em placa de petri 21

Figura 9) Esquema de cultivo líquido meio ISP-2	23
Figura 10) Esquema cultivo em placas de Petri e avaliação da produção de metabólitos em função do tempo	24
Figura 11) Esquema e extração em meio sólido de arroz	26
Figura 12) Esquema de fracionamento experimento halo de inibição entre <i>Streptomyces</i> sp. Act2 e <i>Aspergillus niger</i> .	30
Figura 13) Fracionamento cultivo líquido <i>Streptomyces</i> sp Act1 e <i>Streptomyces</i> sp Act2	32
Figura 14) Figura observa-se a formação do halo de inibição contra o fungo <i>Aspergillus niger</i> (em preto) na região central da foto. Ao lado esquerdo inferior da foto (em branco) pode-se observar o crescimento de <i>Streptomyces</i> sp. Act1 e ao lado direito inferior da foto (em branco) o crescimento de <i>Streptomyces</i> sp. Act2.	40
Figura 15) Halo de inibição entre <i>Streptomyces</i> sp Act2 (acima) e <i>A. niger</i> (abaixo) após 7 dias de inibição.	41
Figura 16) Análise por HPLC. Gradiente acetonitrila :água, 1ml/min, 1mg/ml, 265nm . Amostras do experimento de halo de inibição	43
Figura 17 a b) Análise por HPLC .Gradiente acetonitrila/água, 1mL/min, 1mg/mL, 265nm. 17a) extrato halo após partição com acetato de etila. 17b) extrato halo metanólico	44
Figura 18) Cromatogramas obtidos pela análise das subfrações obtidas após o fracionamento com resina sephadex LH- 20. Experimento do halo de inibição. Subfrações S4, S5 e S6. Em azul detetor RID, em verde detector UV-DAD. Fase móvel acetonitrila:água, concentração 1mg.mL ⁻¹ , vazão 1mL.min ⁻¹ .	46
Figura 19) Espectros de RMN de ¹ H das amostras S4, S5(13), S6 (D ₂ O, 500 MHz).	48
Figura 20 a,b,c) Comparação entre os espectros de RMN de ¹ H das amostras halo- partição acetato de etila, Act2 interação acetato de etila e Act2 líquido acetato de etila.	50
Figura 21) Espectros RMN de ¹ H das amostra Act 2 – AcOEt 7d e Act2 – AcOEt 15d. (D ₂ O, 500 MHz).	52
Figura 22) Crescimento meio sólido <i>Streptomyces</i> sp Act1 a) e de	53

Streptomyces sp Act2 b) após 10 dias em BOD, temperatura controlada à 30 °C

Figura 23) Crescimento meio sólido *Streptomyces* sp. Act1 à esquerda, 54
branco ao centro e *Streptomyces* sp. Act2 à direita após 21 dias em
BOD, mantendo a temperatura controlada à 30°C.

Figura 24) Perfil cromatográfico das frações obtidas por Sephadex LH - 56
20 da amostra Act1 sólido. Gradiente acetonitrila:água,
1mL/min, 1mg/mL, 200nm, 300mn.

Figura 25) Perfil cromatográfico analítico gradiente metanol:água da 57
amostra Sephadex 1-2. Gradiente metanol:água, 1mL/min, 1mg/mL,
247nm. À esquerda curva de absorção no ultravioleta (UV) do pico 2 com
tempo de retenção 11,98 minutos.

Figura 26) Perfil cromatográfico coluna preparativa C-18. Modo 58
isocrático metanol 12%, fluxo 6mL min⁻¹, 231nm, HPLC reciclante.
Amostra Sephadex 1-2.

Figura 27) Perfil cromatográfico coluna preparativa C-18. Modo 58
isocrático metanol 12%, fluxo 2mL/min, 231nm, HPLC reciclante.
Amostra Sephadex 1-2 pico 1

Figura 28) Espectros de RMN de ¹H da amostra Sephadex 1-2, 59

Figura 29) Crescimento em meio sólido após 21 dias. À esquerda da 61
foto cultivo sólido água do mar – Branco, *Streptomyces* sp. Act1 e
Streptomyces sp. Act2. À direita cultivo sólido água normal Act1,
Branco, Act2.

Figura 30) Perfil cromatográfico analítico das subfrações obtidas após 63
fracionamento com resina Sephadex – Act1.

Figura 31) Perfil cromatográfico analítico gradiente das subfrações 65
obtidas após fracionamento da amostra Act1- Mar com resina XAD-
16.A.Fase móvel acetonitrila:água, concentração 1mg.mL⁻¹, vazão
1mL.min⁻¹.

Figura 32) Perfil cromatográfico para isolamento da fração XAD-16/4 66
Act1 sólido mar.

Figura 33) Perfil cromatográfico das subfrações 5 e 6 provenientes do 67
isolamento com resina XAD-16 do extrato de cultivo sólido com água do

mar da linhagem *Streptomyces* sp. Act1.

Figura 34) Espectro de RMN de ^1H dos pico 1 e 2 provenientes das amostras 4, 5, 6 (D_2O , 500 MHz). 69

Figura 35) Perfil cromatográfico das frações acetato de etila e hexano obtidas da partição do extrato bruto Act1 mar. Gradiente acetonitrila:água, 1ml/min, 1mg/ml. 70

Figura 36) Espectro de RMN de ^1H fração acetato de etila. Cultivo sólido com água do mar. Act1 (D_2O , 500 MHz). 71

Figura 37) Perfil cromatográfico analítico das subfrações da amostra Act2- Mar fracioandas com resina Sephadex-LH20. Fase móvel acetonitrila:água, concentração 1mg.mL^{-1} , vazão 1mL.min^{-1} . 73

Figura 38) Perfil cromatográfico analítico das subfrações amostra Act2- Mar fracionadas com resina Xad-16.Fase móvel acetonitrila:água, concentração 1mg.mL^{-1} , vazão 1mL.min^{-1} 75

Figura 39) Perfil cromatográfico das frações acetato de etila e hexano obtidas da partição do extrato bruto Act2 mar. Fase móvel acetonitrila:água, concentração 1mg.mL^{-1} , vazão 1mL.min^{-1} . 76

Figura 40) Espectro de RMN de ^1H fração acetato de etila. Cultivo sólido com água do mar. Act2 (D_2O , 500 MHz). 77

Figura 41) Cultivo em meio líquido com água do mar. Linhagem *Streptomyces* sp. Act2 após 7 dias de crescimento. À esquerda da foto observa-se o branco do experimento e à direita da foto observa-se o crescimento da linhagem *Streptomyces* sp.Act2. 77

Figura 42) Espectro de RMN de ^1H fração acetato de etila. Cultivo líquido com água do mar de *Stretomyces* sp Act2 (D_2O , 500 MHz). 79

Figura 43) Espectro de RMN de ^1H fração butanol. Cultivo líquido com água do mar de *Streptomyces* sp. Act2 (D_2O , 500 MHz). 80

Figura 44) Perfil cromatográfico comparativo das frações acetato de etila, butanol e hexano obtidas da partição do extrato bruto do cultivo líquido de Act2 com água do mar. Coluna C-18 analítica. Fase móvel gradiente acetonitrila:água, vazão 1mL.min^{-1} , concentração 1mg.mL^{-1} . 81

Figura 45) Perfil cromatográfico das subfrações acetato de etila. Coluna C-18 analítica, Fase móvel gradiente acetonitrila:água, 1mL.min^{-1} , 84

1mg.mL⁻¹.

Figura 46) Perfil cromatográfico das subfrações butanol. Coluna C-18 85 analítica. Fase móvel gradiente acetonitrila:água, 1mL.min⁻¹, 1mg.mL⁻¹.

Figura 47) Perfil cromatográfico das subfrações butanol sílica flash. 86 Coluna C-18. Fase móvel gradiente acetonitrila:água, 1mL.min⁻¹, 1mg.mL⁻¹.

Figura 48) Espectros de RMN de ¹H fração 4.1 Cultivo líquido com água 86 do mar *Streptomyces* sp. Act2 (CDCl₃, 500 MHz).

Resumo

Micro-organismos são profícuos produtores de produtos naturais bioativos. Diversos fármacos inovativos e de extrema importância clínica são de origem microbiana, como antibióticos, antitumorais, imunossupressores e agentes hipolipêmicos. A maioria dos fármacos de origem microbiana é produzida por actinobactérias. A estreita associação de micro-organismos com plantas, insetos, crustáceos e organismos marinhos, pode induzir a produção de substâncias bioativas, que eventualmente conferem vantagens adaptativas e ecológicas ao macro-organismo hospedeiro. Ambientes marinhos e áreas de transição como os manguezais são ainda pouco explorados para estudos químicos e farmacológicos dos micro-organismos presentes nos solos e em simbiose com outros hospedeiros. Neste sentido, o presente trabalho visou o estudo químico monitorado por ensaios de citotoxicidade em células cancerígenas de dois micro-organismos, *Streptomyces* sp. Act1 e *Streptomyces* sp. Act2, isolados da casca do caranguejo do maguezal, *Ucides cordatus*, coletado em Cananéia, SP. Estes micro-organismos apresentaram atividade antagônica frente ao fungo patogênico *Aspergillus niger*, confirmando o potencial para produção de substâncias bioativas. Os micro-organismos foram cultivados em diferentes meios de cultura para avaliar o potencial de crescimento, perfil químico dos extratos obtidos e atividade citotóxica dos extratos e subfrações. Os meios de cultura escolhidos foram meio líquido ISP-2 e meio sólido (arroz), e ainda, nestas mesmas condições foi avaliado o efeito do uso de água do mar de forma comparativa. Os micro-organismos desenvolveram-se adequadamente nos diferentes meios de cultivo. Os fracionamentos dos extratos obtidos nos experimentos evidenciaram características polares das subfrações obtidas, e neste sentido foram necessárias adaptações das técnicas de separação, incluindo fases estacionárias como sephadex LH-20 e fase reversa. Os ensaios de citotoxicidade frente às linhagens de células tumorais com os extratos obtidos mostraram o grande potencial das linhagens em estudo, em especial a linhagem *Streptomyces* sp. Act-2 cultivada na presença de água do mar.

Palavras-chave: produtos naturais microbianos, actinobactérias, simbiose, antimicrobiano, antitumoral.

Abstract

Microorganisms are prolific producers of bioactive natural products. Most of innovative pharmaceuticals that have useful clinical importance have been isolated from microorganisms, such as antibiotics, anticancer drugs, immunosuppressive drugs and lipid-lowering agents. Most of the drugs of microbial origin are produced by actinomycetes. The close association of micro-organisms with plants, insects, crustaceans or marine organisms may induce the production of bioactive substances. These natural products may confer adaptive advantages to the environment and to the host organism. Marine and transitional areas such as mangroves are still under explored for chemical and pharmacological studies of both soil microorganisms and symbiotic microorganisms. In this sense, this work aimed a chemical study of two actinobacteria strains, *Streptomyces* sp. Act1 and *Streptomyces* sp. Act2, guided by cancer cells cytotoxicity assays. Both microorganisms were isolated from the shell of the mangrove crab *Ucides cordatus*, collected in Cananéia, SP. These microorganisms showed antagonistic activity against the pathogenic fungus *Aspergillus niger*, confirming the potential for production of bioactive substances. Microorganisms were cultured in different culture media to assess the potential for growth, chemical profile of extracts and cytotoxic activity of extracts and subfractions. The culture media were chosen using liquid (ISP-2) and solid medium (rice). The effect of addition of saline water in the culture media has also been evaluated. The microorganisms developed adequately in different culture media. The fractions of extracts obtained from the experiments showed characteristics of polar subfractions obtained, requiring the use of sephadex LH-20 and reverse phase as chromatographic stationary phases. Cytotoxic assays of the extracts against cancer cell lines showed the great potential of the strains under study, mainly *Streptomyces* sp. Act2, grown in the presence of seawater.

Keywords: microbial natural products, actinomycetes symbiosis, antimicrobial, antitumoral.

INTRODUÇÃO

Introdução

1.1) Actinobactérias como fontes de metabólitos secundários e fármacos

Nutricionalmente, fisicamente e biologicamente o solo é um ambiente particularmente complexo e que apresenta composição variável. *Streptomyces* estão entre as bactérias presentes em maior quantidade e que se destacam por apresentarem propriedades singulares. Actinobactérias são essenciais para o meio ambiente uma vez que essas são capazes de apresentar ampla capacidade de processamento de material biológico e realizar reações de biotransformação. Como exemplo pode ser citada a degradação de compostos insolúveis produzidos por outros organismos como lignanocelulose e quitina (biopolímeros). Esta capacidade de metabolizar matéria orgânica caracteriza as actinobactérias como micro-organismos centrais no ciclo de reciclagem de carbono (BENTLEY et al., 2002).

Actinobactérias do gênero *Streptomyces* apresentam um complexo desenvolvimento multicelular, o que geralmente não acontece com outras bactérias presentes no solo. As actinobactérias apresentam estruturas singulares como ramificações, crescimento na forma de micélios vegetativos e pseudo-hifas aéreas que posteriormente vão dar origem às longas cadeias de esporos reprodutivos (BENTLEY et al., 2002). A importância medicinal das actinobactérias está relacionada à capacidade de produção de mais de dois terços dos antibióticos derivados naturais utilizados na clínica além de vários fármacos agentes antitumorais e imunossupressores que são produzidos por complexas vias de produção de metabólitos secundários (BENTLEY et al., 2002).

Newman e Cragg (2007) analisaram a origem dos fármacos desenvolvidos e aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*) entre 1981 a 2006 e concluíram que 63% das pequenas moléculas consideradas como novas entidades químicas apresentavam alguma correlação com produtos naturais. Destes fármacos, 6% são totalmente originários de produtos naturais, 28% são derivados semissintéticos e 29% são derivados miméticos ou de síntese total,

porém foram baseados nos grupos farmacofóricos de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2007).

Recentemente, Ganesan (2008) reavaliou os dados publicados por Newman e Cragg em 2007, aplicando filtros para analisar de fato as contribuições inovadoras dos produtos naturais na terapêutica após 1970. Desta análise resultaram 24 fármacos (produtos naturais ou derivados semissintéticos), dos quais 54% (n=13) foram obtidos de actinobactérias de solo, 21% de plantas, 17% de fungos e 8% de bactérias (Figura 1). Estes dados demonstram o grande potencial dos micro-organismos, em especial as actinobactérias, como fonte de obtenção de novos produtos naturais com aplicação farmacêutica.

Figura 1) Distribuição dos fármacos inovativos derivados de produtos naturais (adaptado de GANESAN, 2008).

Os micro-organismos (fungos e bactérias) apresentam grande relevância na área de descoberta de novos fármacos (GANESAN, 2008). A maioria dos antibióticos de uso clínico é de origem microbiana, incluindo os próprios produtos naturais e seus derivados semissintéticos, produzidos principalmente por actinobactérias do gênero *Streptomyces* e por fungos (PUPO et al., 2006). Alguns dos antibióticos usados clinicamente e produzidos por actinobactérias do gênero *Streptomyces* encontram-se na Figura 2.

Figura 2) Alguns antibióticos, de uso clínico como antibacterianos, isolados de espécies de *Streptomyces* (dalbavancina é um derivado semi-sintético em fase de registro).

Antibióticos de origem natural também representam uma parcela significativa dos fármacos usados na quimioterapia do câncer. Novamente, o gênero *Streptomyces* destaca-se como o principal produtor de antibióticos anticancerígenos exemplificados por bleomicinas, actinomicina D, mitomicina C e antraciclinas (daunorrubicina), ilustrados na Figura 3 (PUPO *et al.*, 2006). Nesta área terapêutica o desenvolvimento contínuo de resistência das células tumorais aos agentes quimioterápicos disponíveis motiva a busca por novos protótipos para o desenvolvimento de agentes anticancerígenos.

Figura 3) Alguns antibióticos antitumorais de uso clínico isolados de espécies de *Streptomyces*.

A grande diversidade de substâncias bioativas em uso clínico, produzida principalmente por espécies de *Streptomyces* de solo, motiva a busca por substâncias em novos nichos de actinobactérias, tanto do gênero *Streptomyces* quanto outros gêneros menos explorados. As actinobactérias de origem marinha são constituintes de um ecossistema com potencial para descoberta de novos compostos bioativos uma vez que as condições ambientais nos oceanos são muito diferentes das condições encontradas nos solos terrestres (SIVAKUMAR et al., 2007).

Por mais de meio século o cultivo de *Streptomyces* sp. terrestres resultou em uma ampla diversidade de isolamento de metabólitos secundários biologicamente ativos. Atualmente os estudos químicos envolvendo *Streptomyces* sp. vêm buscando novos nichos ecológicos como os marinhos. Atualmente há uma constante necessidade de descoberta de novos antibióticos e a busca por habitats ainda pouco explorados poder ser profícua para a descoberta de novos compostos bioativos (HUGHES et al., 2007).

1.2) Actinobactérias de sedimentos marinhos e produção de metabólitos secundários

Actinobactérias marinhas são capazes de produzir uma ampla variedade de metabólitos secundários, sendo que alguns metabólitos apresentam potencial para serem utilizados como agentes terapêuticos. Os *Streptomyces* sp. marinhos são portanto uma fonte profícua e ainda pouco explorada para a descoberta de novos metabólitos secundários (LAM, 2006).

Segundo LAM (2006), mais de 70% da superfície do nosso planeta é coberta por oceanos. Nestes ecossistemas marinhos que incluem fundos de oceanos e áreas de transição como recifes de corais existe grande diversidade microbiológica. As pressões seletivas ambientais como diferenças de pressão, salinidade, diferenças de temperatura e pH, por exemplo, são fatores seletivos que refletem tanto na variabilidade genética quanto das rotas metabólicas que foram necessárias para adaptação desses micro-organismos durante o processo evolutivo.

Embora as pesquisas na área de isolamento de metabólitos secundários produzidos por actinobactérias marinhas seja recente, a tabela 1 ilustra a ampla diversidade de classes de metabólitos secundários isoladas no período de 2003 a 2005 relatadas na literatura.

Em especial pode-se citar a salinosporamida A, uma nova β -lactona- γ -lactama, agente citotóxico inibidor do proteassoma 20S, isolada de *Salinospora tropica*. Tem potencial para o tratamento de melanomas, sendo 500 vezes mais ativo que o análogo salinosporamida B, que não apresenta cloro na estrutura (EUSTAQUIO et al., 2007). Além desses compostos da linhagem *Salinospora tropica*, foram isolados dois macrolídeos os sporolídeos A e B, que exemplificam metabólitos secundários que apresentaram estruturas inéditas (figura 4) (LAM, 2006).

Ainda sobre a linhagem *Salinospora tropica* é importante ressaltar a presença de uma enzima clorinase responsável por promover a incorporação de átomos de cloro como ocorre com na salinosporamida A. A linhagem *Salinospora*

tropica só consegue se desenvolver em ambiente exclusivo salino (EUSTAQUIO et al., 2007)

Tabela 1. Novos metabólitos produzidos por actinobactérias marinhas durante o período de 2003 à 2005. Adaptada de (LAM, 2006).

Composto	Micro-organismo	Atividade
Aureoverticilactama	<i>Streptomyces aureoverticillatus</i>	Anticancer
Bonactina	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacteriano/antifúngico
Caprolactonas	<i>Streptomyces</i> sp.	Anticancer
Indóis 3,6 di-substituídos	<i>Streptomyces</i> sp.	Anticancer
Frigociclinona	<i>Streptomyces griseus</i>	Antibacteriano
Glaciapirroles	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacteriano
Glutingimicina	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacteriano
Himalomicina	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacteriano
Komodoquinona A	<i>Streptomyces</i> sp.	Atividade neuritogênica
Lajollamicina	<i>Streptomyces nodosus</i>	Antibacteriano
Salinosporamida A	<i>Salinospora topica</i>	Anticancer
Sporolídeos	<i>Salinospora topica</i>	sem atividade
Trioxacarcinas	<i>Streptomyces</i> sp.	antibacteriano, anticancer, antimalárico

Figura 4) Metabólitos secundários isolados de *Salinospora topica*

Actinobactérias marinhas também são responsáveis pela produção de metabólitos secundários que apresentam glicosídeos. Da linhagem *Salinospora pacifica* foram isolados cianosporasídeos A e B que são compostos que além da parte glicosídica também apresentam átomo de cloro na estrutura (Figura 5) (OH et al., 2005).

Compostos lipofílicos que apresentam atividade citotóxica também foram isolados de *Streptomyces* sp. marinhos presentes no ecossistema de manguezal. As caprolactonas (*R*)-10-metil-6-undecanolídeo e (6*R*,10*S*)-10-metil-6 dodecanolídeo foram testadas em ensaios antitumorais e apresentaram promissora atividade contra células cancerígenas e uma baixa citotoxicidade para as células normais (STRITZKE, et al., 2003).

Marinopirróis, compostos derivados do pirrol com substituintes cloro na estrutura, foram isolados de uma linhagem de *Streptomyces* sp. coletada na Califórnia proveniente de sedimentos marinhos encontrados à 51 metros de profundidade. Esta linhagem é obrigatoriamente marinha necessitando de água do mar para seu desenvolvimento. As estruturas isoladas apresentaram-se na forma de bis-pirróis, o que usualmente não é encontrado na literatura. Além disso, os marinopirróis A e B apresentaram potente atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (Figura 5) (HUGHES, et al., 2007).

Figura 5) Cianospirasídeos A e B isolados de *Salinospora pacifica*. Marinopirróis isolados de *Streptomyces* sp., micro-organismos obrigatoriamente marinhos.

Na literatura há um relato de um *Streptomyces* sp. isolado de sedimentos marinhos do Alasca produtor de três novos pirrol-sesquiterpenos (glicianopirróis) e compostos da classe das dicetopiperazinas (MARCHERLA, et al., 2006).

Streptomyces sp. isolados de sedimentos marinhos do mar do sul da China foram capazes de promover reações de biotransformação estereoespecífica em isoflavonas. Esses micro-organismos apresentaram atividade β -glucosidase. Deve-se ressaltar a importância comercial dessas reações de biotransformação, uma vez que a biodisponibilidade da aglicona em relação ao heterosídeo de flavonóide é maior e mais efetiva para prevenção de doenças crônicas (HU et al., 2009).

Analisando os dados publicados por Olano e colaboradores (2009) observa-se a distribuição por classes de compostos antitumorais produzidas por actinobactérias marinhas (Figura 6). A maioria dos compostos é de origem policetídisca (52%) provenientes de reações de condensação de Claisen e catalizadas por enzimas chamadas policetídeo sintases (PKSs).

Figura 6) Distribuição percentual representativa das classes de compostos antitumorais isolados de actinobactérias marinhas. Adaptado de (OLANO, et al., 2009).

Segundo Udvary e colaboradores (2007), análises do genoma de *Salinospira tropica*, marinha, mostraram que existem genes biossintéticos organizados em *clusters* responsáveis pela produção de metabólitos secundários. Neste micro-organismo foi demonstrado que aproximadamente 10% do genoma é

voltado para produção de metabólitos secundários sendo que neste genoma existe uma grande diversidade de genes que podem ser transcritos e traduzidos à policetídeo sintetases (PKSs) e peptídeos sintetases não ribossomais (NRPSs).

1.3) Actinobactérias e a produção de compostos bioativos

Um grande número de compostos antitumorais são produtos naturais ou seus derivados, produzidos principalmente por micro-organismos, em especial actinobactérias. As classes estruturais desses compostos que podemos destacar são as antraciclinas (aclerubínica, daunomicina e doxorubicina), peptídeos (bleomicina e actinomicina D), antimetabólitos (pentoestatina e mitomicina), indolocarbazóis, policetídeos, isoprenóides, macrolídeos e peptídeos não-ribossomais. Em especial, observa-se que os micro-organismos marinhos possuem a capacidade de produzir compostos farmacologicamente interessantes (OLANO, et al., 2009).

Um exemplo que ilustra uma das classes de compostos bioativos produzidos por actinobactérias são os heptapeptídeos cíclicos ciclomarinas A- C, ilustradas na figura 7 abaixo, isoladas de *Streptomyces* sp. coletados na região de San Diego, Califórnia. Esses peptídeos contêm quatro aminoácidos não usuais e são produzidos quando o micro-organismo encontra-se em condições salinas (halofílicos). O composto ciclomarina A apresentou potencial atividade citotóxica e em especial atividade antiinflamatória tanto *in vitro* quanto *in vivo* (RENNER, et al., 1999).

Na literatura existem relatos de relações simbióticas entre *Streptomyces* sp. marinhos e algas vermelhas *Porphyra* ssp. economicamente importantes no Japão. O *Streptomyces* sp. em mutualismo com a alga é capaz de produzir uma proteína termoestável de 160 kDa ativa contra o fungo patogênico *Pythium porphyrae* (WOO, et al., 2002).

Figura 7) Peptídeos cíclicos isolados de *Streptomyces* sp. marinhos. 1) Ciclomarina A, 2) Modificação estrutural na posição 49 resulta no composto Ciclomarina B, 3) Modificação estrutural na posição 2 e 3 resulta na Ciclomarina C.

1.4) Ecossistema manguezal e hospedeiro *Ucides cordatus*

Os manguezais caracterizam-se como ecossistemas tropicais estando presentes em especial na América Central, Caribe, Índia, Península da Indochina, Brasil e Austrália. No atlântico ocidental, está presente desde a costa da Flórida nos Estados Unidos da América até o estado de Santa Catarina no Brasil (MELO, 1996).

No Brasil a área de manguezais é avaliada em aproximadamente 13.000 km². Os estados mais representativos deste ecossistema que detêm aproximadamente 50% de área de manguezais são Maranhão, Amapá, estados que estão inserido na Amazônia Brasileira. (CASTRO et. al, 2008).

O caranguejo *Ucides cordatus*, Linnaeus (1764), conhecido popularmente por caranguejo-uçá é uma espécie de extrema importância presente nessas áreas de ecossistema de manguezal. Sendo assim associado a esta espécie podemos correlacionar a importância ecológica e sócio-econômica para essas regiões (GLASER e DIELE, 2004).

O ecossistema de manguezal apresenta importância ecológica no ciclo de reciclagem de matéria orgânica. As tocas de *Ucides cordatus* estão presentes no solo dos manguezais e são locais de alta reciclagem de carbono uma vez que esses caranguejos alimentam-se de folhas senescentes contribuindo desta forma com o processo de degradação de matéria orgânica vegetal (OLMOS; SILVA, 2003). A biomassa produzida é enriquecida de carbono, nitrogênio e bactérias que promovem a retenção de nutrientes e energia dentro da floresta de manguezal (NORDHAUS, 2003).

Segundo Nordhaus (2003), o processo de oxigenação das camadas mais profundas do mangue tem influência no incremento das biomassas microbianas presentes no solo, em especial micro-organismos decompositores responsáveis pelo fluxo de nutrientes e energia.

Visto que existe um grande potencial para o estudo da produção de metabólitos secundários em *Streptomyces* sp. isolados de ambiente marinhos e áreas de transição como o manguezal decidiu-se trabalhar com duas linhagens *Streptomyces* sp. Act1 e Act2, obtidas pela colaboração com a Embrapa meio ambiente. A disponibilidade das linhagens e o fato dos micro-organismos terem sido isolados do caranguejo *Ucides cordatus* foram fatores que influenciaram na decisão de investigar o perfil químico e metabolismo desses *Streptomyces* em diferentes meios de cultivo.

OBJETIVOS

2) Objetivos

O objetivo principal deste trabalho foi a investigação do potencial químico e biológico de duas linhagens *Streptomyces* sp. Act1 e *Streptomyces* sp. Act2. As etapas envolvidas para o cumprimento dos objetivos foram:

- Cultivar as linhagens *Streptomyces* sp. Act1 e *Streptomyces* sp. Act2 em diferentes meios de cultivo(semi-sólido, líquido e sólido) para a obtenção de extratos
- Realizar o fracionamento dos extratos e analisar a produção de metabólitos secundários por HPLC-UV e RMN de ^1H .
- Avaliar a atividade citotóxica dos extratos e das frações.

MATERIAS E MÉTODOS

3) Materiais e Métodos

3.1) Equipamentos e condições de uso:

- Capela de fluxo laminar

- ✓ Veco®VL FS-09 M

- Autoclave vertical

- ✓ Phoenix® AV75

- Estufa de incubação

- ✓ FANEM Ltda® -347CD

- Mesa agitadora

- ✓ INNOVA TM 4300 New Brunswick Scientific

- Evaporador

- ✓ BUCHI® modelo rotavapor R

- Cromatografia líquida de alta eficiência modo analítico (HPLC)

- ✓ Equipamento Shimadzu® Shim-Pak. Diodo array detector, software Class-VP
- ✓ Coluna analítica CLC-ODS 250mm X 4,5mm
- ✓ Fase móvel gradiente de acetonitrila em água (0-30min, 10% a 100% de acetonitrila; 30-32min, 100% de acetonitrila; 32-40min, 100% a 10% de acetonitrila).
- ✓ Tempo total de análise: 40 minutos.
- ✓ Volume de injeção 20µL de cada amostra
- ✓ Fase de solubilização das amostras: acetonitrila e/ou água na concentração de 1mg.mL⁻¹, à vazão de 1mL.min⁻¹,
- ✓ Detecção em UV na faixa de 190 a 370nm.

- Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) modo preparativo, semi-preparativo e reciclante

- ✓ Equipamento Shimadzu® Shim-Pak. Diodo array detector, software labsolution

- ✓ Coluna semi-preparativa VP250/10 nucleosil 120-5 C18 250 mm x 10,0 mm, 5 µm (Macherey-Nagel) acoplada a pré-coluna 15 mm x 9,4 mm, 7 µm (Agilent Technologies).
- ✓ As análises procederam-se em coluna semi-preparativa e preparativa utilizando como fase móvel metanol:água em proporções volumétricas de acordo com as características das amostras obtidas após outros fracionamentos.

- Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA)

Os extratos e frações mais apolares:

- ✓ Placas de sílica de 5cm X 5cm em cuba com fase móvel mais apolar preenchida com volume de 5ml.

Os extratos e frações mais polares:

- ✓ Placas de C-18, fase reversa de 5cm X 5cm em cuba com fase móvel mais polar preenchida com volume de 5ml.

- Análises de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ¹H)

- ✓ Equipamento aparelho Bruker DRX ®,
- ✓ Frequência de 500 MHz para ¹H e 125 mHz para ¹³C
- ✓ Solubilização das amostras de acordo com a polaridade nos solventes deuterados:
Metanol (CD₃OD), água (D₂O) e clorofórmio (CDCl₃).
- ✓ Tubos de RMN 5 mm Branson1200 (Branson Ultrasonics Corporation); serie 500, 7 pol. (Sigma Aldrich); tubos RMN grade 7 U-P PK-5 (Kontes Glass Company).

3.2) Ensaio biológico de citotoxicidade em células tumorais

Análises de citotoxicidade dos extratos e das frações foram realizadas pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. As linhagens tumorais utilizadas, HCT-8 (cólon - humano), SF-

295 (glioblastoma - humano) e MDA-MB435 (melanoma - humano), foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

A citotoxicidade da amostra foi avaliada pelo método do MTT (Mosman, 1983). As células foram plaqueadas em placas de 96 cavidades nas seguintes densidades: 0,3 x 10⁶ (HL-60), 0,7 x 10⁵ (HCT-8 e PC3), 0,6 x 10⁵ (SF-295), 0,1 x 10⁶ (MDAMB-435) e 3 x 10⁵ (linfócitos). As amostras foram adicionadas e as placas foram incubadas por 72 h em estufa a 5% de CO₂ a 37°C.

As amostras foram testadas em várias concentrações (0,39 – 25µg/mL) em triplicata em três experimentos independentes. As absorbâncias foram obtidas com o auxílio de um espectrofotômetro de placa a 595 nm. (GALLO, et al. 2009).

3.3) Métodos

3.3.1) Reativação e conservação das linhagens dos micro-organismos

As actinobactérias (*Streptomyces* sp) foram isoladas da casca do caranguejo *Ucides cordatus* no laboratório de pesquisa do Prof. Dr. Itamar Soares Melo, localizada em Jaguariúna na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento por Satélite- Jaguariúna.

Primeiramente foram retirados dos respectivos tubos inclinados com meio International Streptomyces Project-2 (ISP-2) sólido pequenos fragmentos das linhagens de *Streptomyces* sp. Act 1 e *Streptomyces* sp. Act2 e inoculados separadamente em meio ISP-2 líquido mantendo sobre agitação de 120 rpm por 4 dias até observar crescimento dos micro-organismos.

Após reativação das respectivas linhagens com auxílio de uma alça de platina os micro-organismos foram transferidos para tubos inclinados com meio sólido de ISP-2 e foram posteriormente preservados pelo método de Castellani, (1939) com finalidade de manutenção de um estoque para os experimentos do presente trabalho.

3.3.2) Sequenciamento genético das linhagens *Streptomyces* sp. Act1 e *Streptomyces* sp. Act2

O sequenciamento genético da região ITS das linhagens foi realizado pela empresa Genotyping Biotecnologia (Botucatu, SP). Primeiramente foi realizado o plaqueamento das duas linhagens seguido da extração do DNA, amplificação por (polymerase chain reaction) PCR, purificação da reação e sequenciamento de duas colônias diferentes

3.3.3) Cultivos

3.3.3.1) Cultivo em meio semi-sólido ISP-2

Experimento de antagonismo para análise de halo de inibição

Neste trabalho visou-se avaliar a capacidade de produção de substâncias bioativas pelas linhagens de *Streptomyces* sp em meio de cultivo semi-sólido. Foi avaliada a atividade inibitória ao crescimento do fungo patogênico *Aspergillus niger* em experimento de antagonismo em placas de Petri com meio de cultura ISP-2.

As actinobactérias *Streptomyces* sp. Act2 e *Streptomyces* sp. Act1 foram reativadas do estoque do laboratório através da inoculação de esporos dessas bactérias em meio de ISP-2 líquido por 48 horas à temperatura de 30 °C e 120 rpm a fim de se obter um pré-inóculo. Os pré-inóculos de Act2 e Act1 foram inoculados separadamente em placas de petri contendo meios semi-sólidos de ISP-2 e permaneceram por 72 horas em estufa à 30°C. Após os 3 dias, observando o crescimento inicial de *Streptomyces* sp. Act2 e de *Streptomyces* sp. Act1 nas placa de Petri, o fungo *Aspergillus niger* proveniente do estoque do laboratório teve seus esporos inoculados no centro das placas de cultura a fim de observar o crescimento e a possível formação da zona de inibição de crescimento.

As placas de petri com os dois micro-organismos foram mantidas em estufa por 30 °C por mais quatro dias completando no final do experimento um período

total de 7 dias no qual foi possível visualizar a formação por completo do halo de inibição.

Após o período dos sete dias, os procedimentos de extração foram realizados na seguinte sequência: separa-se os locais de crescimento do fungo *Aspergillus niger*, zona de inibição (halo) e os locais de crescimento das actinobactérias.

Como controle do experimento realizou-se cultivos isolados e separados em placas de petri com meio ISP-2 das actinobactérias e do fungo *Aspergillus niger*.

Cada parte foi extraída com álcool etílico (99,5%) por um período de 24 horas seguindo posteriormente procedimentos de filtração, rotaevaporação do solvente à temperatura de 55 °C e concentração da amostra. Posteriormente os extratos foram secos em ar comprimido à temperatura ambiente até eliminação de qualquer resquício residual de solvente.

Primeiramente foram feitas 3 placas de *Streptomyces* sp. Act2 e 3 placas de *Streptomyces* sp. Act1 separadamente para testar a inibição do crescimento por formação de halo de inibição ao *Aspergillus niger*. Este critério foi utilizado para escolher qual dos dois micro-organismos seria mais efetivo para inibição do crescimento fúngico. Como *Streptomyces* sp. Act 2 teve resultado visivelmente favorável, este foi o micro-organismo de escolha para reproduzir o teste inicial em duas escalas. Foram realizadas 45 placas com *Streptomyces* sp. Act2, das quais foram extraídas o halo de inibição e as respectivas áreas de crescimento do fungo e de *Streptomyces* sp. Act 2. Foram feitas também duas placas somente com meio ISP-2 para controle, duas placas de fungo *Aspergillus niger* isolado e três placas de Act 2 isolada. Posteriormente o experimento foi repetido para *Streptomyces* sp. Act2 realizando um cultivo com 100 placas, porém em apenas 60 placas o halo de inibição foi extraído a fim de obter maior massa para realizar as análises químicas.

A ilustração do experimento encontra-se na figura 8 abaixo

Figura 8) Experimento antagonismo em placa de petri

3.3.3.2) Experimento cultivo em meio líquido (ISP-2) *Streptomyces* sp Act1 e *Streptomyces* sp Act 2.

Para cada linhagem, *Streptomyces* sp. Act1 e *Streptomyces* sp. Act2 foram feitos os todos os passos do experimento descrito a seguir. Pequenos fragmentos de micélio-ágar dos micro-organismos foram transferidos para dois tubos de ensaio com meio ISP-2 com volume de aproximadamente 10 mL. Após este procedimento os tubos permaneceram em agitação por 48 horas até observar ligeiro crescimento e turvação do meio de cultura (liberação de esporos). Em seguida, com auxílio de um swab os micro-organismos foram inoculados em placas de Petri com meio ISP-2 sólido permanecendo em estufa (30 °C) por um período de 3 dias. Após este período com o auxílio de um tubo de transferência vinte fragmentos de aproximadamente 0,5 cm de diâmetro foram retirados da

placa de Petri e inoculados em meio líquido de ISP-2 utilizando-se de erlenmeyer de 500mL contendo 200mL de meio líquido ISP-2 cada um a fim de preparar um pré-inóculo. Foram feitos 3 pré-inóculos para cada linhagem. Os pré-inóculos foram mantidos em agitação em shaker por 48h na temperatura de 30 °C, 120 rpm. Após o período de 48h uma alíquota de 20mL de pré-inóculo foi transferida para cada erlenmeyer de 500mL contendo meio líquido de ISP-2 em um volume de 180 mL para cada erlenmeyer que foram previamente autoclavados por 15 minutos para garantir total eliminação de micro-organismos contaminantes no experimento.

Os erlenmeyers foram mantidos durante o período de sete dias em shaker com temperatura controlada (30 °C) e 120 rpm até completar o tempo de crescimento padronizado no experimento.

Para cada linhagem foi feito um erlenmeyer branco com meio líquido de ISP-2 com a finalidade de controle comparativo. No total foram feitos 10 erlenmeyers para cada linhagem mais dois brancos totalizando em 22 erlenmeyers o experimento final.

Após o período dos sete dias, os procedimentos de extração foram realizados na seguinte sequência: adição de álcool etílico (99.5%) em volumes de 50mL para cada erlenmeyer com meio líquido de ISP-2 com volume de extrato de 200mL. Após este procedimento o extrato foi filtrado com membrana de celulose e concentrado em rotaevaporador. O extrato com a fase hidro-alcóolica foi submetido à rotaevaporação do solvente à temperatura de 55°C e concentração ligeira da amostra. Em seguida procedeu-se a partição com solvente orgânico em ordem crescente de polaridade, iniciando-se com hexano, em seguida acetato de etila e finalizando com álcool *n*-butílico. A proporção de solvente utilizada foi de 300 mL de extrato para 100 mL solvente (a menor quantidade de água possível para solubilização do extrato). Para tanto foram realizadas três extrações com cada solvente a fim de garantir maior rendimento das extrações sem saturar o solvente extrator. As frações de hexano, acetato de etila e álcool *n*-butílico foram concentrados em evaporador rotatório sob pressão reduzida, e a secagem foi

finalizada nos frascos sob ar comprimido à temperatura ambiente até eliminação total de qualquer resquício de solvente.

A figura 9 ilustra o esquema de cultivo em meio líquido ISP2.

Figura 9) Esquema de cultivo líquido meio ISP-2

3.3.3.3) Experimento de avaliação da produção de metabólitos em função do tempo

A avaliação da produção de metabólitos em função do tempo foi realizada para fins comparativos com o experimento do halo de inibição. Portanto os experimentos foram realizados em placa de Petri. Como *Streptomyces* sp Act 2 apresentou resultado mais relevante em comparação à *Streptomyces* sp Act 1 para o experimento do halo de inibição este experimento da produção de metabólitos foi realizado apenas para linhagem *Streptomyces* sp Act2.

Streptomyces sp Act2 foi reativada do estoque do laboratório através da inoculação de esporos dessa bactéria em meio de ISP-2 líquido por 48 horas à temperatura de 30°C e 120 rpm a fim de se obter um pré-inóculo. O pré-inóculo de

Streptomyces sp Act2 foi inoculado com o auxílio de um swab em meio semi-sólido de ISP-2 permaneceu por 72 horas em estufa à 30°C. O período preconizado para observar o crescimento ou a variação da produção de metabólitos foi primeiramente 7 dias e em seguida 15 dias.

O experimento foi realizado com 4 placas para 7 dias e 4 placas para 15 dias e uma placa de branco somente com meio ISP-2 sólido.

Após o período de crescimento, as placas foram extraídas por metodologia de maceração com álcool etílico (99,5%) por um período de 24 horas seguindo posteriormente procedimentos de filtração, rotaevaporação do solvente à temperatura de 55°C e concentração da amostra. O extrato foi em seguida particionado com acetato de etila na proporção de volume 3:1.

Posteriormente os extratos etanólicos e de acetato de etila foram concentrados sob pressão reduzida em evaporador rotatório e a secagem finalizada em ar comprimido à temperatura ambiente até eliminação de qualquer resquício de solvente.

A figura 10 ilustra o esquema do experimento para avaliação da produção de metabólitos em função do tempo

Figura 10) Esquema cultivo em placas de Petri e avaliação da produção de metabólitos em função do tempo.

3.3.3.4) Cultivo em meio sólido de arroz

Após a reativação das linhagens em tubo de ensaio com meio líquido ISP-2, pequenos fragmentos dos micro-organismos foram transferidos para placas de Petri com meio ISP-2 sólido permanecendo em estufa (30 °C) por um período de 7 dias. Após este período, com o auxílio de um tubo de transferência (Fischer®) 20 fragmentos de aproximadamente 0,5 cm de diâmetro foram retirados da placa de Petri e inoculados em meio líquido de ISP-2 utilizando-se de erlenmeyer de 500mL com 100mL de meio líquido ISP-2 cada um a fim de preparar um pré-inóculo. Foram feitos 3 pré-inóculos, mantidos em agitação em shaker por 48h na temperatura de 30 °C, 120 rpm. Após o período de 48h uma alíquota de 10mL de pré-inóculo foi transferida para cada erlenmeyer de 500mL contendo meio sólido de arroz (90g de arroz parbolizado com 100mL de água deionizada) previamente autoclavado por 40 minutos para garantir total eliminação de micro-organismos contaminantes no experimento.

Primeiramente foi feito um teste experimental com 7 erlenmeyers de *Streptomyces* sp. Act 2 e 10 erlenmeyers de *Streptomyces* sp Act1 e um erlenmeyer branco apenas com controle contendo 90g de arroz e 10mL de ISP-2 líquido para padronizar o experimento. O crescimento dos micro-organismos em meio sólido de arroz foi monitorado em BOD durante 21 dias mantendo a temperatura controlada à 30°C.

Após o período de crescimento padronizado, foram realizadas extrações com álcool etílico (99,5%) em volumes de 150mL para cada erlenmeyer com meio sólido de arroz durante o período 24 horas. Após as 24 horas filtrou-se o álcool da maceração e procedeu-se uma transferência para um erlenmeyer de maior volume. Foram adicionados mais 100mL de álcool etílico absoluto (99,5%) aos erlenmeyers de cultivo sólido de arroz para realizar uma segunda extração a fim de melhorar o rendimento final do extrato. Nesta segunda extração com álcool etílico procedeu-se também uma sonificação durante 5 minutos, realizada para em

cada um dos erlenmeyers. O volume final do extrato foi rotaevaporado e liofilizado para obtenção do extrato bruto seco (figura 11).

Figura 11) Esquema cultivo e extração em meio sólido de arroz

3.3.3.5) Cultivo em meio sólido de arroz com água do mar

Neste experimento objetivou-se avaliar um parâmetro diferencial na condição de cultivo em meio sólido de arroz. Para tanto foi utilizada água do mar no cultivo, uma vez que os micro-organismos *Streptomyces* sp. foram isolados da casca do caranguejo que vive em região de alta concentração salina. Para que o experimento fosse realizado a água do mar foi cedida pelo laboratório da professora Dra. Hosana Maria Deboni. A água passou por procedimento de dupla filtração para remover impurezas presentes.

As linhagens *Streptomyces* sp. Act 1 e *Streptomyces* sp. Act 2 primeiramente foram reativadas em tubo de ensaios com meio líquido ISP-2 (no meio de reativação foi utilizado água destilada permanecendo em shaker por 4 dias à 120 rpm).

Pequenos fragmentos dos micro-organismos foram transferidos para placas de Petri com meio ISP-2 sólido (preparado com água destilada) permanecendo em estufa (30°C) por um período de 7 dias. Após este período com o auxílio de um tubo de transferência (Fischer®) vinte fragmentos de aproximadamente 0,5cm de diâmetro foram retirados da placa de Petri e inoculados em meio líquido de ISP-2 (no meio líquido preparado foi utilizada água destilada) utilizando-se erlenmeyers de 500mL com 100mL de meio líquido ISP-2 cada um a fim de preparar um pré-inóculo. Foram feitos 3 pré-inóculos, mantidos em agitação em shaker por 48h na temperatura de 30°C, 120 rpm. Após o período de 48h uma alíquota de 10mL de pré-inóculo foi transferida para cada erlenmeyer de 500mL contendo meio sólido de arroz (90g de arroz parbolizado com 100mL de água do mar filtrada) previamente autoclavado por 40 minutos para garantir total eliminação de micro-organismos contaminantes no experimento.

Para cada uma das linhagens foram feitos 25 erlenmeyers e um branco apenas com controle contendo 90g de arroz, 110mL de ISP-2 líquido preparado com água do mar filtrada para padronizar o experimento. O crescimento dos micro-organismos em meio sólido de arroz foi realizado em BOD durante 21 dias mantendo a temperatura controlada à 30°C.

Após o período de crescimento foram realizadas extrações com álcool etílico (99,5%) em volumes de 150mL para cada erlenmeyer com meio sólido de arroz durante o período 24 horas. Após as 24 horas filtrou-se o álcool da maceração e procedeu-se uma transferência para um erlenmeyer com a cultura microbiana de maior volume. No dia seguinte mais 100mL de álcool etílico absoluto (99,5%) foram adicionados aos erlenmeyers de cultivo sólido de arroz para realizar uma segunda extração a fim de melhorar o rendimento final do extrato. Nesta segunda extração com álcool etílico procedeu-se também uma sonificação por 5 minutos realizada em cada um dos erlenmeyers. A solução final do extrato foi rotaevaporada e liofilizada para obtenção do extrato bruto seco.

3.3.3.6) Experimento de cultivo líquido água do mar linhagem *Streptomyces* sp. Act2

Primeiramente *Streptomyces* sp. Act2 foi reativada seguindo protocolo descrito em **3.3.1)**. Pequenos fragmentos do micro-organismo foram transferidos para dois tubos de ensaio com meio ISP-2 (preparado com água destilada) com volume de aproximadamente 10 mL. Após este procedimento os tubos permaneceram em agitação por 48 horas até observar ligeiro crescimento e turvação do meio de cultura (liberação de esporos). Em seguida com auxílio de um swab os micro-organismos foram inoculados em placas de Petri com meio ISP-2 (preparado com água destilada) sólido permanecendo em estufa (30°C) por um período de 3 dias. Após este período com o auxílio de um tudo de transferência (Fischer®) 20 fragmentos de aproximadamente 0,5 cm de diâmetro foram retirados da placa de Petri e inoculados em meio líquido de ISP-2 utilizando-se de erlenmeyer de 500 mL com 200 mL de meio líquido ISP-2 cada um a fim de preparar um pré-inóculo. Foram feitos 3 pré-inóculos. Os pré-inóculos foram mantidos em agitação em shaker por 48h na temperatura de 30 °C, 120 rpm. Após o período de 48h uma alíquota de 20mL de pré-inóculo foi transferida para cada erlenmeyer de 500 mL contendo meio líquido de ISP-2 (preparado com água do mar) em um volume de 180 mL para cada erlenmeyer, que foram previamente autoclavados por 15 minutos para garantir total eliminação de micro-organismos contaminantes no experimento.

Os erlenmeyers foram mantidos durante o período de 7 dias em shaker com temperatura controlada (30°C) e 120 rpm até completar o tempo de crescimento padronizado no experimento.

Foi feito um erlenmeyer branco com meio líquido de ISP-2 com água do mar com a finalidade de controle comparativo. No total foram feitos 20 erlenmeyers para linhagem de *Streptomyces* sp. Act2.

3.3.4) Fracionamento e análise dos extratos

3.3.4.1) Fracionamento e análises dos extratos obtidos do cultivo em meio semi-sólido ISP-2 experimento halo de inibição

Partindo-se de uma massa de 2,10g de fração aquosa de halo solúvel em metanol, essa foi primeiramente filtrada em membrana de celulose e posteriormente submetida à separação por peso molecular utilizando-se da resina Sephadex LH-20. Foram recolhidas 16 frações com volume aproximado de 10 mL cada fração. Após secagem das frações em ar comprimido essas foram reunidas em 6 frações finais, baseando-se no perfil cromatográfico desenvolvido em placas (CCDA) de C-18 fase reversa, eluindo no modo isocrático metanol:água na proporção volumétrica de 1:1 em cuba com volume de 5 mL de fase móvel. Após este procedimento as 6 frações foram submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência.

Para as análises de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H), as frações de interesse foram solubilizados em solvente água deuterada (D_2O) pela característica polar das amostras.

As frações de maior interesse para trabalho encontram-se em destaque na figura 12, onde estão as metodologias desenvolvidas no presente trabalho para o experimento de cultivo em meio semi-sólido ISP-2 para realização de tentativas de purificação tanto da subfração acetato de etila quando da fração solúvel em metanol.

Figura 12) Esquema de fracionamento experimento halo de inibição entre *Streptomyces* sp. Act2 e *Aspergillus niger*.

3.3.4.2) Fracionamento e análises dos extratos do experimento de avaliação produção de metabólitos em função do tempo

Os extratos obtidos do cultivo realizado com sete dias e quinze dias foram submetidos a partição com solvente orgânico acetato de etila. Para as análises por RMN de ^1H , as frações acetato de etila, 7 dias e 15 dias foram solubilizadas em solvente água deuterada (D_2O) pela característica polar das amostras e analisadas na frequência de 500 MHz.

3.3.4.3) Fracionamento e análises dos extratos e frações obtidas do experimento de cultivo líquido em meio ISP- 2 das linhagens *Streptomyces* sp. Act 1 e *Streptomyces* sp. Act 2

As frações obtidas após a partição dos extratos brutos do cultivo líquido de *Streptomyces* sp. Act1 e *Streptomyces* sp Act2 foram analisadas em HPLC e posteriormente por RMN de ^1H , 500 MHz, D_2O .

Neste experimento priorizou-se trabalhar de forma comparativa no experimento de antagonismo halo de inibição. Os perfis químicos obtidos no cultivo semi-sólido e no cultivo líquido, foram comparados priorizando as análises para a linhagem *Streptomyces* sp Act2. Sendo esta escolha justificada pela melhor atividade apresentada da linhagem *Streptomyces* sp Act2 no experimento de halo de inibição como demonstrado na figura 13.

A fração de acetato de etila obtida no cultivo líquido foi submetida à tentativas de separação e purificação em cartucho Sep-Pak C-18 (1g). Amostras de 200 mg da fração de acetato de etila foram homogeneizadas em celite para obtenção de uma pastilha. Foram aplicadas no cartucho utilizando-se como fase móvel metanol:água com gradiente decrescente de polaridade iniciando-se com metanol 20% e finalizando com metanol 100%. Para cada gradiente de polaridade foi recolhida uma alíquota de 10mL. No total foram recolhidas 10 frações. Estas frações foram concentradas em rotaevaporador e ar comprimido até total evaporação do solvente. Após a secagem foram analisadas por cromatografia de camada delgada em placas de 5 cm por 5 cm eluindo no modo isocrático metanol:água na proporção volumétrica de 1:1 em cuba com volume de 5mL de fase móvel.

Figura 13) Fracionamento cultivo líquido *Streptomyces* sp Act1 e *Streptomyces* sp Act2.

3.3.4.4) Fracionamento e análises dos extratos e frações obtidas do experimento de cultivo sólido em meio de arroz da linhagem *Streptomyces* sp Act1

A metodologia utilizada para isolamento de metabólitos secundários para extrato bruto de cultivo sólido da Act1 foi eluição em coluna com resina Sephadex-LH20.

Partindo-se de uma massa de 7,14g (parte solúvel em metanol) esta fração foi primeiramente filtrada em membrana e posteriormente submetida à separação por peso molecular utilizando-se da resina Sephadex LH-20 empacotada em coluna 40cm altura / 2,5 cm diâmetro fase móvel álcool metílico 100%.

Foram recolhidas 13 frações com volume aproximado de 10 mL cada fração. Após secagem das frações em ar comprimido essas foram reunidas em 7 frações finais, baseando-se no perfil cromatográfico desenvolvido em placas de CCDA C-18. Após este procedimento as 7 frações finais foram submetidas à análise por HPLC. Para as frações de interesse foram realizados experimentos de por de RMN de ¹H, 500 MHz, D₂O.

Para o experimento de isolamento de metabólitos em cultivo sólido de *Streptomyces* sp. Act1 os procedimentos de separação utilizando-se Sephadex LH-20 também foram realizados mais duas vezes com o restante da massa de extrato bruto

obtido do cultivo sólido inicial. As massas iniciais submetidas ao fracionamento foram de 10,12g e 5,31 g. As outras duas separações reproduziram de forma satisfatória o perfil de eluição tanto em cromatografia em coluna utilizando resina Sephadex LH-20 quando em cromatografia em camada delgada utilizando placas de fase reversa C-18.

As frações de maior interesse provenientes das outras duas colunas também foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência como descrito acima e submetidas à análise de RMN de ^1H utilizando-se solvente D_2O pela característica polar das amostras.

Uma posterior purificação de uma das frações provenientes da separação por coluna de Sephadex LH-20 foi realizada no HPLC reciclante. No fluxograma 1 está descrito de maneira esquemática os procedimentos de purificação do extrato de cultivo sólido de *Streptomyces* sp. Act1.

3.3.4.5) Fracionamento e análises dos extratos e frações obtidas do experimento de cultivo sólido em meio de arroz da linhagem *Streptomyces* sp Act2

Para o extrato do cultivo de arroz de *Streptomyces* sp. Act2 foi realizada apenas uma coluna com resina Sephadex LH-20 (14 cm x 2,5 cm) partindo-se de uma massa inicial de extrato solúvel em álcool metílico de 6,16 g.

Foram recolhidas 22 frações de aproximadamente 10mL que posteriormente foram reunidas em 8 subfrações mediante comparação do perfil de eluição por CCDA utilizando-se de placas de sílica de fase reversa C-18 fase móvel álcool metílico:água na proporção volumétrica 1:1. As frações que apresentaram maior complexidade de perfil cromatográfico foram submetidas a um outro fracionamento utilizando cartucho de C-18 utilizando-se gradiente álcool metílico:água iniciando-se com 90% de água e finalizando com 100% álcool metílico com gradiente decrescente de polaridade.

No fluxograma 2 estão descritos de maneira esquemática os procedimentos de purificação do extrato de cultivo sólido de *Streptomyces* sp. Act2.

Fluxograma 1: Esquema de purificação e separação extrato *Streptomyces* sp. Act1 cultivo sólido

Fluxograma 2: Esquema de purificação e separação extrato de *Streptomyces* sp. Act2 cultivo sólido

3.3.4.6) Fracionamento e análises dos extratos e frações obtidas do experimento de cultivo sólido em meio de arroz com água do mar da linhagem *Streptomyces* sp Act1

Foram realizadas três tipos de fracionamento do extrato bruto obido por cultivo sólido com água do mar:

- a) Solubilização do extrato bruto liofilizado com metanol, filtração, seguida de fracionamento em resina Sephadex LH20 e análise das frações obtidas por HPLC analítico.
- b) O extrato liofilizado foi fracionado diretamente em resina XAD-16 seguida de posterior análise das frações obtidas em HPLC analítico.
- c) A partição líquido-líquido do extrato bruto liofilizado foi realizada com hexano e acetato de etila, posteriormente foram realizadas análises em HPLC analítico.

As frações de interesse provenientes dos fracionamentos foram submetidas a análises de RMN de ^1H em D_2O .

As amostras obtidas pela partição do extrato bruto com hexano e acetato de etila das linhagens de *Streptomyces* sp. Act1 e *Streptomyces* sp. Act2 foram submetidos a ensaios de citotoxicidade de acordo com a descrição do item 3.2).

3.3.4.7) Fracionamento e análises dos extratos e frações obtidas do experimento de cultivo sólido em meio de arroz com água do mar da linhagem *Streptomyces* sp Act2

Para o extrato bruto obtido do cultivo sólido com água do mar de *Streptomyces* sp. Act2 foram realizados os mesmos procedimentos (a à c) descritos no item acima.

As frações de interesse provenientes dos fracionamentos foram submetidas a análises de RMN de ^1H em D_2O .

3.3.4.8) Fracionamento e análises dos extratos e frações obtidas do experimento de cultivo líquido em meio de arroz com água do mar da linhagem *Streptomyces* sp Act2

Após o período dos sete dias, os procedimentos de extração foram realizados na seguinte sequência: adição de álcool etílico (99,5%) em volumes de 50 mL para cada erlenmeyer com meio líquido de ISP-2 com volume de extrato de 200 mL. O extrato com álcool etílico foi submetido a rotaevaporação do solvente à temperatura de 55 °C e concentração ligeira da amostra. Em seguida procedeu-se a partição com solvente orgânico em ordem crescente de polaridade: iniciando-se com hexano, em seguida acetato de etila finalizando com álcool *n*-butílico. A proporção de solvente utilizada foi de 300 mL de extrato para 100 mL solvente. Foram realizadas três extrações com cada solvente a fim de garantir maior rendimento das extrações sem saturar o solvente extrator. As frações em hexano, acetato de etila e álcool butílico foram concentradas sob pressão reduzida em evaporador rotatório e a secagem finalizada em ar comprimido à temperatura ambiente até eliminação completa de qualquer resíduo de solvente

As frações obtidas da partição do cultivo líquido com água do mar da linhagem foram analisadas por RMN de ^1H em D_2O para direcionar os posteriores estratégias de fracionamento.

Selecionou-se como metodologia de fracionamento a utilização de cartucho C-18 (água:metanol ordem decrescente de polaridade: água:metanol 90%, 80%, 60%, 50%, 40%, 20% e 100% metanol) para a fração acetato de etila e as posteriores análises das subfrações obtidas foram realizadas em HPLC analítico.

A fração proveniente da partição realizada com butanol foi fracionada novamente utilizando-se resina Sephadex LH-20. As subfrações de interesse obtidas foram submetidas a análises por HPLC analítico. Após análises por CCD das subfrações obtidas, uma apresentou maior interesse e foi submetida a mais um fracionamento utilizando-se coluna clássica empacotada com sílica flash.

Todas as amostras de interesse foram analisadas por RMN ^1H em D_2O , CDCl_3 , e CD_3OD .

3.3.5) Atividade Citotóxica em Células tumorais

3.3.5.1) Experimento do cultivo em meio semi-sólido ISP-2 experimento halo de inibição

Análises de citotoxicidade das subfrações obtidas no experimento denominadas *Streptomyces* sp. Act2, Halo e do Fungo *A. niger* foram realizadas pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará de acordo com o item 3.2).

3.3.5.2) Experimento cultivo em meio sólido de arroz

Foram realizados ensaios de citotoxicidade para os extratos brutos secos de *Streptomyces* sp. Act1 e *Streptomyces* sp. Act2. Para as frações de maior interesse realizaram-se ensaios de citotoxicidade de acordo com a metodologia descrita no item 3.2).

3.3.5.3) Experimento cultivo em meio sólido e em meio líquido com água do mar

As frações obtidas do cultivo em meio sólido de arroz com água do mar (hexano e acetato de etila) das linhagens *Streptomyces* sp. Act1 e *Streptomyces* sp. Act2 foram submetidos a ensaios de citotoxicidade de acordo com a descrição do item 3.2).

As frações obtidas do cultivo líquido com água do mar (hexano, acetato de etila e butanol) da linhagem *Streptomyces* sp. Act2 foram submetidas à ensaios de citotoxicidade de acordo com a descrição do item 3.2).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4) Resultados e Discussão

- Fracionamentos e Análise dos cultivos

4.1) Sequenciamento genético das linhagens Act1 e Act2:

A identificação dos microorganismos por sequenciamento genético apresentou maior identidade para linhagem Act1 com a bactéria *Streptomyces mediolani*, porém no relatório final dos dados realizados pela empresa Genotyping não houve caracterização apenas do gênero *Streptomyces* sp.

Para a linhagem Act2 a maior identidade relatada pelos dados da empresa foi com *Streptomyces* sp.

4.2) Cultivo em meio semi-sólido ISP-2

Experimento de antagonismo para análise de halo de inibição

Neste experimento foi possível observar a formação de halo de inibição das duas linhagens de *Streptomyces* sp. Act1 e *Streptomyces* sp. Act2 frente ao crescimento do fungo patogênico *Aspergillus niger*. Na figura 14 é possível observar a presença do halo de inibição.

Figura 14) Figura observa-se a formação do halo de inibição contra o fungo *Aspergillus niger* (em preto) na região central da foto. Ao lado esquerdo inferior da foto (em branco) pode-se observar o crescimento de *Streptomyces* sp. Act1 e ao lado direito inferior da foto (em branco) o crescimento de *Streptomyces* sp. Act2.

Para a linhagem *Streptomyces* sp Act2 o potencial de inibição apresentado foi maior em comparação a linhagem *Streptomyces* sp Act1, uma vez que a formação do halo de inibição é ligeiramente mais pronunciada em comparação à linhagem *Streptomyces* sp Act1. A partir desta observação a linhagem *Streptomyces* sp Act2 foi a linhagem escolhida para realizar os experimentos. Na figura 15 pode-se observar o halo de inibição promovido pela linhagem *Streptomyces* sp Act2.

Figura 15) Halo de inibição entre *Streptomyces* sp Act2 (acima) e *A. niger* (abaixo) após 7 dias de inibição.

O rendimento de cada fração obtida está descrito na tabela 2 abaixo para o experimento do halo de inibição

Tabela 2. Redimento em miligramas (mg) do experimento halo de inibição.

Experimento Halo	
Amostra/massa	mg
halo	2.131,10
act2_isolada	719,70
branco halo	122,70
fungo_isolado	132,90
act2_interação	329,70
fungo_interação	1.897,76
halo_partição_Ac	27,00

Legendas da tabela:

- Halo: extrato obtido da parte central onde foi possível observar inibição de crescimento.
- Act2 isolada: extrato obtido do crescimento da *Streptomyces* sp. Act2 em placa de Petri isolada.
- Branco halo: extrato obtido das placas com meio ISP-2 para controle.
- Act2 interação: extrato obtido do crescimento da *Streptomyces* sp. Act2 em placa no experimento de antagonismo.
- Fungo interação: extrato obtido do crescimento do fungo em placa no experimento de antagonismo.
- Halo partição Ac: fração acetato de etila obtida do extrato do halo.

Observa-se que o maior rendimento em massa apresentado é do halo, seguido do fungo na interação e da *Streptomyces* sp. Act2 interação. Os extratos do halo, Act2 isolada e Act2 interação foram utilizados para realizar fracionamentos em coluna e análises por RMN de ^1H .

4.3) Análises cromatográficas dos extratos provenientes do cultivo em meio semi-sólido ISP-2. Experimento de antagonismo para análise de halo de inibição

As análises cromatográficas dos extratos Halo, Act2 isolada, fungo isolado e halo de inibição foram feitas primeiramente em HPLC utilizando coluna analítica, gradiente acetonitrila: água como descrito na parte experimental. Cada amostra foi preparada na concentração de 1mg/mL e o comprimento de onda escolhido para a análise foi de 265 nm.

Na figura 16 pode-se observar o perfil cromatográfico das amostras.

Analisando os cromatogramas obtidos no presente experimento não foi possível visualizar nestas condições de análise grande diferença comparativa entre Act2 Branco e Act2 interação, bem como para as análises fungo branco e

Branco halo

Fungo Branco

Act 2 interação

Halo de inibição

Fungo Interação

Act 2 Branco

Figura 16) Análise por HPLC. Gradiente acetonitrila :água, 1ml/min, 1mg/ml, 265nm . Amostras do experimento de halo de inibição

fungo interação. Esse fato pode estar relacionado à ausência de grupos cromóforos nas substâncias produzidas ou a compostos produzidos em pequenas concentrações, não detectáveis nas condições de análise.

Uma outra estratégia para melhorar as análises cromatográficas do halo foi realizar uma partição com solvente acetato de etila na proporção de 1 de solvente para 3 de extrato de halo e analisar a fração acetato de etila em HPLC. Na figura 17 a e b pode-se observar os cromatogramas obtidos do experimento em 300nm e a presença de grupos cromóforos na região entre 5-25 minutos não observados no extrato etanólico.

17a) Halo fração acetato de etila.

17b) halo extrato etanólico

Figura 17 a b) Análise por HPLC .Gradiente acetonitrila/água, 1mL/min, 1mg/mL, 265nm. 17a) extrato halo após partição com acetato de etila. 17b) extrato halo metanólico

O extrato bruto de Halo também passou por procedimento de fracionamento em resina Sephadex LH-20 de acordo com o procedimento descrito na parte experimental. Partindo de uma massa inicial de 2,10g de extrato bruto de halo a fração solúvel em metanol foi filtrada e passou por fracionamento. Após análise por cromatografia CCDA em placa C-18 fase reversa foi possível reunir seis frações finais como descrito na tabela 3.

Tabela 3. Massa das frações Sephadex LH-20 obtidas após fracionamento do extrato de Halo solúvel em álcool metílico.

Sephadex Amostra/massa	Halo de Inibição mg
1 (1-6)	10,90
2 (7)	11,90
3 (8-9)	54,00
4 (10- 12)	18,80
5 (13)	2,60
6 (14-16)	26,10

As amostras provenientes do halo de inibição após fracionamento com resina Sephadex-LH-20 foram analisadas por HPLC analítico com detector de índice de refração (RID) e arranjo de diodos (DAD).

Foram realizadas três injeções das subfrações de maior interesse: S4, S5(13) e S6. A vazão utilizada para o experimento foi de 1ml/min, coluna analítica C-18 na concentração de 1mg/mL.

Na figura 18 pode-se observar os cromatogramas obtidos das subfrações de S4, S5 e S6 obtidas no experimento do halo de inibição.

Pode-se observar através dos diferentes métodos de detecção a grande dificuldade de visualização de compostos. A dificuldade de detecção pode ser atribuída à baixa concentração de substâncias nas subfrações uma vez que o RID só é capaz de detectar substâncias em alta concentração na amostra. A metodologia de detecção por UV dificulta muito a visualização de picos uma vez que as substâncias apresentam características de açúcares por análises de RMN de ^1H e ausência de grupos cromóforos na estrutura.

18a) sephadex S4 **18b) sephadex S5(13)** **18c) sephadex S6**

Figura 18) Cromatogramas obtidos pela análise das subfrações obtidas após o fracionamento com resina sephadex LH- 20. Experimento do halo de inibição. Subfrações S4, S5 e S6. Em azul detetor RID, em verde detector UV-DAD. Fase móvel acetoneitrila:água, concentração 1mg.mL^{-1} , vazão 1mL.min^{-1} .

Foram obtidos espectros de RMN de ^1H para as subfrações denominadas sufrações S4,S5(13) eS 6).

Na figura 19 pode-se observar o espectro de RMN de ^1H das amostras S4, S5(13), S6 obtido em D_2O .

19a) Espectro de RMN de ^1H da amostra S4 (D_2O , 500 MHz).

19b) Espectro de RMN de ^1H da amostra S5 (13) (D_2O , 500 MHz).

19c) Espectro de RMN de ^1H da amostra S6 (D_2O , 500 MHz).

Figura 19) Espectros de RMN de ^1H das amostras S4, S5(13), S6 (D_2O , 500 MHz).

Analisando os espectros da figura 19 obtidos neste experimento pode-se observar a presença de sinais com deslocamentos entre δ 2,5 e 4,5 referentes à hidrogênios presentes em estruturas de açúcares. Além disso, os sinais de hidrogênios ligados à carbonos anoméricos estão presentes nas 3 substancias (S4, S5(13) e S6) com deslocamentos entre δ 5 e 5,5. Os sinais apresentados nos espectros diferenciam dos padrões de glicose e maltose previamente analisados no laboratório sendo, portanto, um indicativo da presença de açúcares diferentes do meio de cultura ISP-2 no halo de inibição. No caso da subfração S6 são observados sinais de hidrogênios ligados a C sp^2 entre δ 7,5 à 8,2. A grande dificuldade na resolução dos sinais e completa purificação pelas técnicas de detecção disponíveis dificultou muito a identificação estrutural dessas substâncias.

Outros procedimentos foram realizados na tentativa de purificar a amostra extrato do halo. Uma das alternativas encontradas foi realizar fracionamento com cartucho

SepPak C18 utilizando gradiente decrescente de polaridade água destilada e metanol. Foram realizadas três tentativas partindo-se sempre de uma massa de 200 mg de extrato e, após o fracionamento, para algumas frações foram realizados experimentos de RMN de ^1H , porém, não foi possível conseguir com sucesso uma separação desejável para o extrato do halo. A grande polaridade dos açúcares provenientes do meio de cultura e dos metabólitos produzidos por *Streptomyces* sp. Act2 dificultou muito os procedimentos de purificação.

4.4) Experimento cultivo em meio líquido ISP-2.

Para o experimento em cultivo líquido ISP-2 priorizou-se realizar uma análise cromatográfica por HPLC, gradiente acetonitrila/água como descrito na parte experimental, das frações obtidas de cada linhagem *Streptomyces* sp. Act2 e *Streptomyces* sp. Act1 que passaram por procedimento de partição com hexano, acetato de etila e butanol. Traçou-se um perfil comparativo com os experimentos controle. Análises dos cromatogramas permitiram observar que não houve diferença significativa no perfil cromatográfico das amostras em comparação ao branco.

Para as amostras Act2 líquido acetato e Act1 líquido acetato foram realizados experimentos de RMN de ^1H em D_2O , 500 MHz.

Os espectros obtidos foram analisados e o que apresentou maior interesse foi o Act2 líquido acetato. Esta amostra Act2 líquido acetato apresentou bastante semelhança comparativa aos perfis dos espectros obtidos no experimento do halo de para as amostras halo (após esse passar por procedimento de partição com acetato de etila) e amostra Act 2 interação (após essa passar por procedimento de partição com acetato de etila).

Na figura 20 pode-se observar os três espectros obtidos nos experimentos.

20a) Espectro de RMN de ^1H da amostra Halo – Partição acetato de etila (D_2O , 500 MHz)

20b) Espectro de RMN de ^1H amostra Act2 interação acetato de etila (D_2O , 500 MHz)

20c) Espectro de RMN de ^1H amostra Act2 líquido acetato de etila (D_2O , 500 MHz)

Figura 20 a,b,c) Comparação entre os espectros de RMN de ^1H das amostras halo-partição acetato de etila, Act2 interação acetato de etila e Act2 líquido acetato de etila.

Analisando de forma comparativa os espectros obtidos, pode-se observar uma semelhança no perfil de RMN de ^1H das amostras: há sinais característicos de hidrogênio de açúcares entre δ 3,5 e 4,0 e entre δ 5,0 e 5,5 alguns sinais na região dos hidrogênios aromáticos entre δ 7,0 e 9,0 e sinais na região das metilas entre δ 0,5 e 1,5. Analisando os sinais obtidos nos três experimentos pode-se observar similaridade, que pode ser um indicativo de produção de metabólitos secundários parecidos. Isso pode ser observado tanto no experimento de cultivo líquido de *Streptomyces* sp Act2 acetato de etila quanto no experimento de halo de inibição para as amostras Act2 interação e halo de inibição, após terem passado por partição com acetato de etila.

Apesar dos rendimentos satisfatórios das frações (Tabela 4) foram encontradas algumas dificuldades para realizar outros procedimentos cromatográficos das amostras, principalmente devido à característica muito polar dos compostos produzidos.

Tabela 4. Redimento em miligramas do experimento de cultivo líquido.

Experimento Cultivo Líquido	
- Meio - ISP2 -	
ACT1	mg
hexano	106,70
acetato	1.290,00
butanol	5.740,00
ACT2	mg
hexano	521,00
acetato	503,60
butanol	9.920,00
BRANCO	mg
hexano	12,10
acetato	55,40
butanol	71,90

4.5) Experimento de avaliação da produção de metabólitos em função do tempo

O experimento foi realizado em placas de Petri contento meio ISP- 2 sólido onde foi priorizado trabalhar com a linhagem *Streptomyces* sp Act2. Tinha-se como objetivo avaliar em função do tempo a possibilidade de haver alguma modificação na produção de metabólitos em função do tempo de crescimento 7 dias e 15 dias.

Os espectros de RMN de ^1H encontram-se na figura 21.

Figura 21) Espectros RMN de ^1H das amostra Act 2 – AcOEt 7d e Act2 – AcOEt 15d. (D_2O , 500 MHz).

Uma análise comparativa dos espectros mostra que não houve variação significativa no perfil de RMN de ^1H sugerindo que mesmo após os quinze dias a produção de metabólitos e consumo de nutrientes parece não variar significativamente.

As massas obtidas no experimento estão ilustradas na tabela 5 abaixo.

Tabela 5. Rendimento em miligramas das amostras obtidas no experimento de avaliação da produção de metabólitos em função do tempo.

Experimento Cultivo Sólido - Placa ISP -2		
Metabólitos em Função do tempo		
Amostra	Dias	massa mg
Act2_isolado	7	363,00
Act2_AcoEt	7	29,00
Act2_Isolado	15	215,90
Act2_AcoEt	15	19,60

4.6) Cultivo em meio sólido de arroz

Neste experimento pode-se avaliar o crescimento das linhagens *Streptomyces* sp. Act1 e *Streptomyces* sp. Act2 em meio sólido e arroz. Na figura 22 pode-se observar a formação de micélios aéreos nas duas linhagens.

22a) *Streptomyces* sp. Act1

22b) *Streptomyces* sp. Act2

Figura 22) Crescimento meio sólido *Streptomyces* sp Act1 a) e de *Streptomyces* sp Act2 b) após 10 dias em BOD, temperatura controlada à 30 °C

Após o período de crescimento de 21 dias outras fotos foram adquiridas para documentar o crescimento final dos micro-organismos. Na figura 23 pode-se observar que na linhagem *Streptomyces* sp. Act2 houve uma alteração na coloração do meio de cultura provavelmente pela produção de metabólitos secundários (pigmentos). Já na

linhagem *Streptomyces* sp. Act1 não foi observada mudança tão significativa da coloração do meio de cultura.

Figura 23) Crescimento meio sólido *Streptomyces* sp. Act1 à esquerda, branco ao centro e *Streptomyces* sp. Act2 à direita após 21 dias em BOD, mantendo a temperatura controlada à 30°C.

Os rendimentos em massa obtidos para o presente experimento estão descritos na tabela 6.

Tabela 6. Rendimentos em massa (miligramas) dos cultivos em meio sólido para as linhagens *Streptomyces* sp. Act1, *Streptomyces* sp. Act2 e branco.

Experimento Cultivo Sólido - ARROZ	
Amostra/massa	mg
Branco Arroz	758,30
Act1_solido	22.212,30
Act2_solido	5.645,70

- Análises cromatográficas dos extratos *Streptomyces* sp. Act1 cultivo sólido:

Para a linhagem *Streptomyces* sp. Act1 optou-se por realizar dois procedimentos com o extrato bruto obtido pelo cultivo em meio sólido de arroz por 21 dias. Foram pesados aproximadamente 9,80g de extrato seco liofilizado, que foram ressuspensos em solução água:metanol na proporção volumétrica de 8:2 (v:v) e então optou-se por

realizar uma partição com solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade (hexano, acetato de etila e álcool *n*-butílico). Porém, os resultados obtidos não foram favoráveis quando analisamos os perfis de RMN de ^1H das subfrações obtidas. As subfrações acetato de etila e butanol apresentaram grande quantidade de açúcares provenientes do meio de cultura mostrando que este procedimento de partição não foi efetivo para pré-purificação das amostras.

Optou-se então, por outra metodologia para isolamento de metabólitos. Foi usada resina Sephadex LH-20 acondicionada com metanol, que seria a estratégia mais indicada para separar compostos mais polares. Foram realizadas três colunas com as respectivas massas de 7,14 g, 10,12g e 5,31g. As frações provenientes das colunas foram reunidas de acordo com a metodologia descrita na parte experimental e comparadas por CCDA e posteriormente HPLC utilizando gradiente acetonitrila:água como descrito na parte experimental obtivemos os cromatogramas da figura 24

24 a) Sephadex - Amostra 1-2

24 b) Sephadex – Amostra 3

24 c) Sephadex – Amostra 4-5

24 d) Sephadex – amostra 6-8

24 e) Sephadex – amostra 9-10 **24 f)** Sephadex – amostra 11 **24 g)** Sephadex – amostra 12-13

Figura 24) Perfil cromatográfico das frações obtidas por Sephadex LH -20 da amostra Act1 sólido. Gradiente acetonitrila:água, 1mL/min, 1mg/mL, 200nm, 300mn.

Analizando o perfil cromatográfico das amostras e o rendimento em massa obtido das frações após separação em resina Sephadex LH-20 encontrado na tabela 7 abaixo optou-se por trabalhar com a Sephadex - Amostra 1-2 para posteriores fracionamentos.

Tabela 7. Rendimento em massa (miligramas) das frações obtidas após a separação em Resina Sephadex LH-20.

Sephadex - Cultivo Sólido - ACT1	
Amostra/massa	mg
Fração 1-2	198,00
Fração 3	731,00
Fração 4-5	1.181,00
Fração 6-7-8	200,00
Fração 9-10	7,48
Fração 11	3,21
Fração 12-13	2,61

A amostra Sephadex 1-2 foi a que se apresentou mais favorável levando em consideração, perfil cromatográfico para que fossem realizados outros procedimentos para separação de metabólitos secundários. Optou-se por trocar o gradiente acetonitrila:água para metanol:água a fim de obter um perfil ideal para separação em escala preparativa.

O cromatograma obtido em gradiente metanol:água mostra dois picos susceptíveis à separação como ilustrado na figura 25.

Figura 25) Perfil cromatográfico analítico gradiente metanol:água da amostra Sephadex 1-2. Gradiente metanol:água, 1mL/min, 1mg/mL, 247nm. À esquerda curva de absorção no ultravioleta (UV) do pico 2 com tempo de retenção 11,98 minutos.

Após a análise em gradiente foi escolhido um modo isocrático para realizar a purificação. A fase móvel escolhida para proceder a análise e separação foi metanol 12%, fluxo de 6 mL min⁻¹, coluna C-18 preparativa. Foram injetados 25mg da amostra em 500 µL de fase móvel água:metanol na porcentagem volumétrica de 12% de metanol. Na figura 26 pode-se encontrar o perfil cromatográfico de separação que permitiu, no modo reciclante, isolar o pico 2. Foi necessário realizar dois ciclos para poder separar o pico 2 que apresentou coloração rosa. Nessas condições foi possível separar os dois picos como ilustrado na figura 26 abaixo.

Figura 26) Perfil cromatográfico coluna preparativa C-18. Modo isocrático metanol 12%, fluxo 6 mL min^{-1} , 231nm, HPLC reciclante. Amostra Sephadex 1-2.

O pico 2 foi coletado no segundo reciclo, o solvente concentrado em rotaevaporador até completa secagem e a amostra pesada, resultando em 2mg de massa seca.

Após a separação do pico 2 do pico 1, foram realizadas outras sequências de fracionamento para o pico 1.

Partindo-se de uma massa de 32mg da subfração (1), injetou-se em coluna C-18 escala preparativa com fluxo de 2 mL/minuto , 231nm utilizando fase móvel isocrática com metanol 12%, HPLC reciclante. Foi necessário realizar um ciclo para poder remover as impurezas presentes na amostra nos tempos de retenção inferiores à 28,46 minutos. Este pico então foi submetido à um reciclo e as outras impurezas foram retiradas. Foi coletado somente o pico com tempo de retenção 56,97 minutos (figura 27).

Figura 27) Perfil cromatográfico coluna preparativa C-18. Modo isocrático metanol 12%, fluxo 2 mL/min , 231nm, HPLC reciclante. Amostra Sephadex 1-2 pico 1

O pico 1 da amostra Sephadex 1-2 foi rotaevaporado até secagem final e pesado, totalizando 4,06mg de um composto de coloração amarela. Para essa amostra realizou-se experimento de RMN de ^1H .

O espectro de RMN de ^1H mostrou sinais de hidrogênios característicos de açúcares na região com deslocamentos químicos de hidrogênios mais intensos na região de δ 3,5 à 4,0. Observa-se também a presença de sinais de hidrogênios ligados à carbonos anoméricos na região entre δ 5,0 e 5,5.

Abaixo na figura 28 pode-se observar os deslocamentos químicos apresentados da amostras Sephadex 1-2 pico1.

Figura 28) Espectros de RMN de ^1H da amostra Sephadex 1-2, pico 1

- Análises cromatográficas dos extrato ds *Streptomyces* sp. Act2 cultivo sólido

Para a linhagem *Streptomyces* sp. Act2 optou-se por realizar o procedimento de separação utilizando resina Sephadex LH-20 com o extrato bruto obtido pelo cultivo em meio sólido de arroz por 21 dias. Essa metodologia foi mais apropriada para a separação de compostos da linhagem Act1 cultivo sólido, portanto decidiu-se iniciar o fracionamento do extrato desta forma. Partindo-se de uma massa inicial de extrato solúvel em álcool metílico de 6,16 g foi realizada uma coluna com resina Sephadex LH-

20 como descrito na parte experimental. Foram coletadas 22 frações que posteriormente foram reunidas em 8 subfrações mediante comparação do perfil de eluição por CCDA em fase reversa C-18 fase. Os rendimentos das frações obtidos estão descritos na tabela 8

Tabela 8. Rendimentos em massa (mg) das frações obtidas após a separação em resina Sephadex LH-20.

Sephadex Cultivo Sólido - ACT2	
Amostra/massa	mg
Fração 1	44,30
Fração 2-5	4.076,50
Fração 6-7	803,00
Fração 8-9	75,70
Fração 10-12	91,90
Fração 10-12	36,20
Fração 13-15	26,40
Fração 16-18	8,50
Fração 19-20	5,51

Com as amostras Fração 2-5, Fração 6-7 e Fração 8-9, foram feitas separações utilizando cartucho Sep-Pak de C-18 com gradiente decrescente de polaridade metanol:água. Para as subfrações mais apolares foram realizadas colunas com sílica gel, mas sem sucesso no isolamento e identificação de compostos de interesse.

4.7) Cultivo em meio sólido de arroz com água do mar

Para avaliar um parâmetro diferencial nas condições de cultivo em meio sólido e em meio líquido, optou-se por realizar cultivos com água do mar uma vez que os micro-organismos foram isolados da casca do caranguejo que vive em região de alta salinidade.

Os cultivos com água do mar foram realizados de acordo com o protocolo descrito na parte experimental. As fotos das culturas foram adquiridas após o crescimento final de 21 dias em BOD dos cultivos sólidos de *Streptomyces* sp. Act1 e *Streptomyces* sp. Act2 água do mar ilustram com clareza as diferenças obtidas.

Na figura 29 pode-se observar as diferenças promovidas no cultivo das duas linhagens. A linhagem *Streptomyces* sp. Act1 apresentou crescimento mais lento no meio mais rico em sais. Permaneceu com micélios em coloração branca, porém, houve menor crescimento observável em comparação ao cultivo com água normal. Já para linhagem *Streptomyces* sp. Act2 pode-se observar uma grande diferença na coloração do micélio apresentado no cultivo do mar (preto) em comparação ao cultivo com água normal (castanho) e maior favorecimento do crescimento e esporulação. Portanto, para *Streptomyces* sp. Act2 houve uma diferença mais significativa observável em função do aumento da salinidade favorecendo o crescimento do micro-organismo nestas condições.

Figura 29) Crescimento em meio sólido após 21 dias. À esquerda da foto cultivo sólido água do mar – Branco, *Streptomyces* sp. Act1 e *Streptomyces* sp. Act2. À direita cultivo sólido água normal Act1, Branco, Act2.

Os rendimentos dos cultivos em meio sólido utilizando água do mar estão descritos na tabela 9.

Tabela 9. Rendimentos em massa (gramas) experimento cultivo sólido com água do mar.

Experimento Cultivo Sólido - Arroz Mar	
Amostra/massa	g
Branco	1,682
ACT1 mar	30,5
ACT2 mar	27,3

4.8.) Experimento de cultivo sólido com água do mar da linhagem *Streptomyces* sp. Act1

- Fracionamento com resina sephadex LH-20 do extrato de cultivo sólido com água do mar de *Streptomyces* sp. Act1

Para a linhagem *Streptomyces* sp. Act1 a fase estacionária selecionada para purificação do extrato bruto proveniente do cultivo em água do mar escolhida foi resina Sephadex LH-20, eluída com metanol. Partindo-se de uma amostra de 3g, procedimentos de solubilização em metanol e filtração foram realizados. Foram coletadas 22 frações e reunidas em 5 frações finais. Na tabela 10 pode-se observar as massas obtidas para cada subfração.

Tabela 10. Rendimentos em massa (mg) experimento cultivo sólido com água do mar Act1- Sephadex LH20

Sephadex Act1	mg
1	113,96
2	181,64
3	135,77
4	43,03
5	12,66

Os cromatogramas obtidos do fracionamento realizado com resina Sephadex-LH20 encontram-se na figura 30.

Figura 30) Perfil cromatográfico analítico das subfrações obtidas após fracionamento com resina Sephadex – Act1.

Pode-se observar a presença de grupos cromóforos passíveis de detecção por UV-DAD nas amostras 1, 3 e 4, mostrando assim grande complexidade na produção de compostos detectáveis, porém, em baixa concentração pela análise da absorção dos picos em mAu. Nos experimentos obtidos com cultivo sólido em água normal, não foi possível observar nenhum composto passível de detecção após fracionamento em Sephadex–LH 20 nas mesmas condições de análise. Pode-se sugerir que a modificação no cultivo pela inserção de água do mar promoveu modificação na produção de metabólitos secundários observado pelo perfil cromatográfico após o fracionamento com Sephadex-LH20 das subfrações provenientes do cultivo sólido de *Streptomyces* sp. Act1.

-Fracionamento com resina XAD-16 do extrato de cultivo sólido com água do mar de *Streptomyces* sp. Act1

Uma outra estratégia de fracionamento escolhida para trabalhar com o extrato bruto do cultivo linhagem *Streptomyces* sp. Act1 usando água do mar foi o fracionamento com resina XAD-16. Partindo-se de uma massa de 4g de extrato *Streptomyces* sp. Act1 cultivo sólido água do mar, este foi fracionado na resina e obteve-se 8 frações com rendimento em massa das frações descritas na tabela 11.

Tabela 11. Rendimentos em massa (mg) experimento cultivo sólido com água do mar Act1- XAD-16.

XAD Act1	mg
1	-
2	568,00
3	113,51
4	70,93
5	63,16
6	39,52
7	30,87
8	30,00

Os cromatogramas obtidos do fracionamento realizado com resina XAD-16 encontram-se abaixo na figura 31.

Figura 31) Perfil cromatográfico analítico gradiente das subfrações obtidas após fracionamento da amostra Act1- Mar com resina XAD-16.A.Fase móvel acetonitrila:água, concentração 1mg.mL^{-1} , vazão 1mL.min^{-1} .

Para o fracionamento do extrato do cultivo de *Streptomyces* sp . Act1 cultivado em meio sólido de arroz com água do mar, optou-se por trabalhar com resina XAD-16, sendo este processo mais eficiente para purificação de compostos como podemos observar nos cromatogramas 3, 4, 5 e 6 obtidos após o fracionamento com resina.

Foram realizados posteriores fracionamentos em HPLC usando coluna semi-preparativa, modo isocrático com 45% de acetonitrila e 55% de água, vazão de $2,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ para as subfrações 4, 5 e 6.

O perfil cromatográfico utilizado como modelo de separação apresenta o seguinte perfil de eluição ilustrado na figura 32.

32a) Perfil de eluição no modo isocrático, coluna analítica c-18. Fase móvel 7:1 acetonitrila:água, concentração $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, vazão $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

32b) Perfil de eluição no modo isocrático, coluna semi-preparativa c-18. Fase móvel 4,5:5,5 acetonitrila:água, concentração $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, vazão $2,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

Figura 32) Perfil cromatográfico para isolamento da fração XAD-16/4 Act1 sólido mar.

Na figura 33 podemos observar o perfil de eluição das amostras 5 e 6 que permitiu o isolamento dos picos 1 e 2 das amostras.

33a) Amostra 5

33b) Amostra 6

Figura 33) Perfil cromatográfico das subfrações 5 e 6 provenientes do isolamento com resina XAD-16 do extrato de cultivo sólido com água do mar da linhagem *Streptomyces* sp. Act1.

As massas em mg dos picos 1 e 2 isolados das frações 4,5 e 6 encontram-se descritas na tabela 12.

Tabela 12. Massa em mg das frações isoladas de XAD-16. Cultivo sólido água do mar da linhagem *Streptomyces* sp. Act1.

Isolamento Cultivo Sólido Act 1 - XAD		mg
amostra 4	1	5,40
	2	2,38
amostra 5	1	9,53
	2	5,41
amostra 6	1	4,80
	2	3,99

Os picos 1 e 2 isolados das frações 4, 5 e 6 foram analisados por RMN de ^1H e os respectivos espectros encontram-se na figura 34.

34a) Espectros RMN de ^1H da amostra 4, pico 1(D_2O , 500 MHz).

34b) Espectros RMN de ^1H da amostra 4, pico 2 (D_2O , 500 MHz).

34c) Espectros RMN de ¹H da amostra 5, pico 2 (D₂O, 500 MHz).

34d) Espectros RMN de ¹H da amostra 6, pico 2 (D₂O, 500 MHz).

Figura 34) Espectro de RMN de ^1H dos pico 1 e 2 provenientes das amostras 4, 5, 6 (D_2O , 500 MHz).

- Partição do extrato de cultivo sólido com água do mar de *Streptomyces* sp. Act1 com solvente orgânico hexano e acetato de etila

A partição orgânica do extrato bruto liofilizado foi realizada com hexano e acetato de etila. Nos cromatogramas abaixo na figura 35 pode-se observar o perfil de eluição em HPLC analítico.

Figura 35) Perfil cromatográfico das frações acetato de etila e hexano obtidas da partição do extrato bruto Act1 mar. Gradiente acetonitrila:água, 1ml/min, 1mg/ml.

Na figura 35 acima pode-se observar compostos que apresentam grupos cromóforos tanto na fração hexano quanto na fração acetato de etila.

Abaixo na figura 36 observa-se o espectro de RMN de ^1H obtido em D_2O da fração acetato de etila proveniente do cultivo sólido realizado com água do mar. Observa-se hidrogênios na região entre δ 3,5 e 4,0 e sinais de hidrogênios ligados à carbono anoméricos podem ser visualizados entre δ 5,0 e 5,5 o que caracteriza a presença de açúcar nesta fração.

Figura 36) Espectro de RMN de ^1H fração acetato de etila. Cultivo sólido com água do mar. Act1 (D_2O , 500 MHz).

4.9) Experimento de cultivo sólido com água do mar da linhagem *Streptomyces* sp. Act2

- Fracionamento com resina sephadex LH-20 do extrato de cultivo sólido com água do mar de *Streptomyces* sp. Act2

Para a linhagem *Streptomyces* sp. Act2 o procedimento de purificação do extrato bruto proveniente do cultivo em água do mar escolhido foi trabalhar com resina Sephadex LH-20. Partindo-se de uma amostra de 4g, procedimentos de solubilização em metanol e filtração foram realizados. Foram coletadas 13 frações e reunidas em 5 frações finais. tabela 15 ilustra as massas em mg obtidas de cada subfração.

Tabela 13. Rendimentos em massa (mg) do experimento cultivo sólido com água do mar Act2- Sephadex LH20

Sephadex Act 2	mg
1	51,42
2	1280,00
3	159,53
4	23,45
5	17,33

Os cromatogramas obtidos do fracionamento realizado com resina Sephadex-LH-20 encontram-se abaixo na figura 37. Foram adquiridos em coluna analítica c-18 com gradiente 1:1 acetonitrila:água, vazão de 1mL min. As amostras encontram-se na concentração de 1mg/ml.

Pode-se observar a ausência de grupos cromóforos passíveis de detecção por UV-DAD nas subfrações provenientes da separação com resina Sephadex – LH 20. A modificação no cultivo pela inserção de água do mar não promoveu modificação no perfil cromatográfico observado após o fracionamento com Sephadex-LH20 das subfrações provenientes do cultivo sólido de *Streptomyces* sp. Act2.

Figura 37) Perfil cromatográfico analítico das subfrações da amostra Act2- Mar fracioandas com resina Sephadex-LH20. Fase móvel acetonitrila:água, concentração 1mg.mL^{-1} , vazão 1mL.min^{-1} .

- Fracionamento com resina XAD-16 do extrato de cultivo sólido com água do mar de *Streptomyces* sp. Act2

Uma outra estratégia de fracionamento escolhida para trabalhar com o extrato bruto do cultivo linhagem *Streptomyces* sp. Act2 mar foi o fracionamento com resina XAD-16. Partindo-se de uma massa de 4g de extrato Act2 cultivo sólido água do mar, este foi fracionado na resina e obteve-se 8 frações com rendimento em massa das frações descritas na tabela 14.

Tabela 14. Rendimentos em massa (mg) experimento cultivo sólido com água do mar *Streptomyces* sp. Act2- XAD-16.

XAD Act2	mg
1	397,9
2	220,3
3	12,2
4	14,1
5	20,4
6	21,3
7	203,5
8	461,9

Os cromatogramas obtidos do fracionamento realizado com resina XAD-16 encontram-se abaixo na figura 38.

Observa-se a ausência de grupos cromóforos detectáveis nessas amostras provenientes do fracionamento utilizando-se resina Xad-16.

Figura 38) Perfil cromatográfico analítico das subfrações amostra Act2- Mar fracionadas com resina Xad-16. Fase móvel acetonitrila:água, concentração 1mg.mL^{-1} , vazão 1mL.min^{-1}

- Partição do extrato de cultivo sólido com água do mar de *Streptomyces* sp. Act2 com solvente orgânico hexano e acetato de etila

A partição orgânica do extrato bruto liofilizado foi realizada com hexano e acetato de etila. Nos cromatogramas da figura 39 podemos observar o perfil de eluição em HPLC analítico.

39a) acetato de etila

39b) hexano

Figura 39) Perfil cromatográfico das frações acetato de etila e hexano obtidas da partição do extrato bruto Act2 mar. Fase móvel acetonitrila:água, concentração 1mg.mL⁻¹, vazão 1mL.min⁻¹.

Observa-se compostos que apresentam grupos cromóforos tanto na fração hexano quanto na fração acetato de etila. Observa-se também a semelhança no perfil de eluição das amostras provenientes tanto da partição realizada com cultivo sólido com água do mar de Act1 e Act2.

Realizou-se experimento de RMN de ¹H em D₂O da fração acetato de etila proveniente do cultivo sólido realizado com água do mar (Figura 40). Observamos deslocamentos químicos na região entre δ 3,5 e 4,0, o que caracteriza a presença de açúcar nesta fração. Os sinais de hidrogênios ligados à carbono anoméricos podem ser visualizados entre δ 5,0 e 5,5.

Figura 40) Espectro de RMN de ^1H fração acetato de etila. Cultivo sólido com água do mar. Act2 (D_2O , 500 MHz).

4.10) Cultivo líquido Act2 com água do mar

Optou-se por realizar um cultivo em meio líquido com a Act2 com água do mar uma vez que esta linhagem apresentou-se mais promissora no quesito resistência à salinidade quando comparou-se o crescimento em cultivo sólido com água do mar. Na figura 41 abaixo pode-se observar o crescimento da Act2 em meio líquido com água do mar após 7 dias de cultivo em shaker com agitação.

Figura 41) Cultivo em meio líquido com água do mar. Linhagem *Streptomyces* sp. Act2 após 7 dias de crescimento. À esquerda da foto observa-se o branco do experimento e à direita da foto observa-se o crescimento da linhagem *Streptomyces* sp. Act2.

Observou-se crescimento característico em meio líquido com água do mar, mostrando desta forma que o micro-organismo pode possuir enzimas salino-resistentes que permitem o desenvolvimento neste meio.

Para o extrato bruto obtido do experimento de cultivo em meio líquido com água do mar optou-se por realizar procedimentos de partição com solvente orgânico em ordem crescente de polaridade (hexano, acetato de etila, *n*-butanol). Os rendimentos em miligramas obtidos no experimento encontram-se descrito na tabela 15.

Tabela 15. Rendimentos em mg das amostras obtidas após partição do extrato bruto líquido Act2 mar e dos brancos do experimento após partição.

Experimento Cultivo Líquido Mar - ACT2	
Amostra/massa	mg
act2_hexano	211,70
act2_acetato	341,40
act2_butanol	1.522,90
branco hexano	34,20
branco acetato	190,80
branco butanol	490,70

4.11) Experimento de cultivo líquido com água do mar da linhagem *Streptomyces* sp. Act2

- Análises de RMN de ^1H e Fracionamento:

Primeiramente realizamos análises de RMN de ^1H para as frações provenientes da partição com hexano, acetato de etila e butanol para direcionar as estratégias de fracionamento. As frações que apresentaram melhor atividade citotóxica foram acetato

de etila e butanol. Na figura 42 podemos visualizar o espectro obtido da fração acetato de etila.

Observou-se grande complexidade do extrato com presença de sinais de hidrogênios mais blindados característicos de cadeias carbônicas metílicas na região de δ 1,0 - 2,0. Hidrogênios ligados a carbonos oxigenados foram observados entre δ 3,5 e 4,0. Os sinais observados entre os deslocamentos químicos de δ 7,0 e 8,5 podem ser característicos de substâncias aromáticas ou heteroaromáticas presentes na região mais desblindada do espectro.

Figura 42) Espectro de RMN de ^1H fração acetato de etila. Cultivo líquido com água do mar de *Stretomyces* sp Act2 (D_2O , 500 MHz).

Figura 43) Espectro de RMN de ^1H fração butanol. Cultivo líquido com água do mar de *Streptomyces* sp. Act2 (D_2O , 500 MHz).

Na figura 43 observa-se os deslocamentos químicos de hidrogênios referentes à fração butanol do cultivo líquido com água do mar. Observa-se sinais mais intensos na região entre δ 3,5 e 4,0 quando comparados com a fração acetato de etila do cultivo líquido com água do mar. Na região mais blindada do espectro são observados sinais de metilas na região entre δ 1,0 e 2,5. Na região mais desblindada do espectro podemos observar sinais de hidrogênios presentes em estruturas aromáticas e heteroaromáticas.

Analisando de forma comparativa aos dados obtidos em experimento de cultivo líquido com água do mar observamos que no espectro de RMN de ^1H para a fração acetato de etila encontramos mais sinais referentes à grupos metílicos e mais sinais na região dos compostos aromáticos e heteroaromáticos em comparação com os espectros obtidos do cultivo líquido da mesma linhagem *Streptomyces* sp. Act2 com água normal. Isto ser um indicativo que a água salinizada favorece a adaptação do micro-organismo e sugere produção de composto com grupos metílicos de forma mais acentuada.

As frações obtidas da partição foram analisadas de forma comparativa aos padrões de branco realizados de cultivo líquido com água do mar. Na figura 44 pode-se observar os cromatogramas obtidos.

44a) acetato líquido mar

44b) branco acetato líquido mar

44c) butanol líquido mar

44d) branco butanol líquido mar

44e) hexano líquido mar

44f) hexano butanol líquido mar

Figura 44) Perfil cromatográfico comparativo das frações acetato de etila, butanol e hexano obtidas da partição do extrato bruto do cultivo líquido de Act2 com água do mar. Coluna C-18 analítica. Fase móvel gradiente acetonitrila:água, vazão $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, concentração $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Analisando os cromatogramas obtidos não foi possível observar grande diferença entre o branco e a fração para as amostras hexano e butanol. A presença de grande quantidade de dificulta a visualização de compostos por detecção por UV devido a ausência de grupos cromóforos ou baixa concentração no extrato em comparação aos açúcares. Para a fração hexano não foi possível visualizar diferença significativa e os cromatogramas não ficaram satisfatórios para análise devido à baixa solubilização das amostras na fase móvel utilizada.

Para a fração acetato de etila pode-se observar a ausência de um pico com tempo de retenção de aproximadamente 6 minutos observado no branco e não observado na amostra de partição acetato de etila. Este pode ser um indicativo que este composto presente no branco pode ter sido consumido durante o cultivo líquido realizado.

Houveram problemas em relação à detecção para as amostras, em especial das frações acetato de etila e butanol devido a grande quantidade de açúcares em relação a grupos que apresentam cromóforos nas amostras analisadas.

Após análise por RMN de ^1H e HPLC das amostras foram adotadas estratégias diferenciadas para o fracionamento das frações acetato de etila e butanol. Para a fração acetato de etila realizou-se o fracionamento com cartucho Sep-Pak C-18 utilizando gradiente crescente de metanol:água. Para a fração butanol realizou-se o fracionamento com resina Sephadex LH-20.

Partindo de uma massa de 341mg da fração acetato de etila, após o procedimento de separação com Sep-Pak C-1, obteve-se quatro subfrações com as respectivas massas indicadas na tabela 16.

Tabela 16. Rendimentos em massa (mg) fracionamento da fração acetato de etila proveniente do cultivo de Act2 com água do mar.

Cartucho C18- Amostra cultivo líquido – Act 2 Acetato de Etila	
Subfração	massa (mg)
1	70,72
2	13,33
3	5,29
4	29,83

Realizou-se para a fração butanol o fracionamento da amostra a partir de uma massa inicial de 1.522,90 g. Apesar da grande quantidade em massa, deve-se levar em consideração a presença de muito sal marinho proveniente do meio de cultivo que foi realizado o cultivo. O fracionamento da fração butanol, após filtração em placa porosa, foi realizado em resina Sephadex LH-20. Na tabela 17 estão descritas as massas obtidas das subfrações.

Tabela 17. Rendimentos em massa (mg) fracionamento da fração butanol proveniente do cultivo de Act2 com água do mar.

Sephadex - Amostra cultivo líquido – Act2	
Butanol	
Subfração	massa (mg)
1	13,52
2	190,04
3	200,44
4	56,86
5	34,43

As frações foram submetidas à HPLC analítico (Figura 45).

45 a) fração 1

45 b) fração 2

45 c) fração 3

45 d) fração 4

Figura 45) Perfil cromatográfico das subfrações acetato de etila. Coluna C-18 analítica, Fase móvel gradiente acetonitrila:água, $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Observamos a presença de picos absorção em 209 nm para as subfrações 1,2 e 3 na região de maior polaridade de fase móvel, entre 5 e 10 minutos. Porém, a baixa quantidade em massa obtida das subfrações 2 e 3 dificultou posteriores fracionamentos das amostras.

Os perfis cromatográficos das subfrações em estão ilustradas na figura 46.

46 a) fração 1

46 b) fração 2

46 c) fração 3

46 d) fração 4

Figura 46) Perfil cromatográfico das subfrações butanol. Coluna C-18 analítica. Fase móvel gradiente acetonitrila:água, $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Pode-se visualizar a presença de um composto que apresenta absorção em 233 nm na subfração 3.

Para a subfração 4 foi realizada uma coluna clássica com sílica flash. A partir de uma massa de 56,86 mg foram coletadas 6 subfrações e analisadas por cromatografia em camada delgada. As amostras de maior interesse (4.1 e 4.2) foram enviadas para experimentos de RMN ^1H . As subfrações 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5 e 4.6 foram analisadas por HPLC na figura 47 podemos observar o perfil cromatográfico obtido.

47 a) fração 4.1

47 b) fração 4.2

47 c) fração 4.3

47 d) fração 4.4

Figura 47) Perfil cromatográfico das subfrações butanol sílica flash. Coluna C-18. Fase móvel gradiente acetonitrila:água, $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Observando os cromatogramas obtidos após o fracionamento com sílica flash não foi possível visualizar compostos com grupos cromóforos nas subfrações analisadas. A subfração 4.1 encontra-se mais pura, porém nas outras subfrações encontramos mistura de compostos. Analisamos por RMN de ^1H as amostras 4.1. Na figura 48 pode-se observar o espectro obtido.

Figura 48) Espectros de RMN de ^1H fração 4.1 Cultivo líquido com água do mar *Streptomyces* sp. Act2 (CDCl_3 , 500 MHz).

Observa-se nos espectros acima para a amostras 4.1 a existência de sinais em 1.2 ppm mais blindados referentes à hidrogênios ligados à carbonos metílicos e metilênicos de estruturas derivadas de ácidos graxos ou policetílicas. Sinais mais desblindados encontrados entre δ 7,6 e 7,9 podendo estar relacionados à hidrogênios presentes em compostos aromáticos.

Na tabela 18 pode-se observar as massas obtidas após o fracionamento realizado em coluna de sílica flash.

Tabela 18. Rendimentos em massa (mg) fracionamento com coluna de sílica flash da fração butanol do cultivo líquido com água do mar da linhagem *Streptomyces* sp. Act2 cultivo com água do mar.

Coluna Sílica Flash	
Amostras Cultivo Líquido Butanol Act2	
Subfração	Massa (mg)
4.1	1,98
4.2	8,36
4.3	1,7
4.4	4,89
4.5	28,51
4.6	3,09

4.12) Ensaios de Citotoxicidade em células tumorais

- Análise do potencial de citotoxicidade do extratos obtidos do experimento de halo de inibição

Na tabela 19 pode-se observar os resultados do ensaio de citotoxicidade frente às células tumorais HCT-8 (cólon - humano), SF-295 (glioblastoma - humano) e MDA-MB435 (melanoma - humano). Comparando com o padrão de doxorrubicina, a amostra de *Streptomyces* sp. Act2 interação apresentou maior atividade nas células HCT-8 e nas células SF-295. Deve-se destacar que nos resultados obtidos para as amostras Act2 isolada e Act2 interação existe uma maior atividade para a amostra Act2 interação. Pode-se sugerir que um contato com outro micro-organismo, no caso o fungo

Aspergillus niger, pode favorecer a produção de metabólitos mais ativos quando comparado ao crescimento isolado do micro-organismo Act2. O branco do meio ISP-2 não apresentou atividade, portanto as atividades dos extratos são devidas às substâncias produzidas pelos micro-organismos. As atividades apresentadas pelas amostras fungo interação e fungo isolado não foram significativas.

Tabela 19. Resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade.

Amostras/Tipos de Células	HCT-8	SF-295	MDAMB-435
Halo	MA (77,32%)	Mo (70,75%)	Mo (74,94%)
Act2- Interação	MA (98,74%)	MA (94,39%)	MA (82,46%)
Act2- Isolada	MA (78,36%)	Mo (71,71%)	Mo (62,88%)
Fungo - Interação	PA (26,25%)	SA	SA
Fungo - Isolado	PA (27,69%)	PA (11,61%)	SA
Branco Meio ISP-2	PA (13,16%)	PA (18,66%)	SA
Doxorrubicina	MA (96,94%)	MA (87,67%)	MA (97,30%)

Legenda: SA (sem atividade), PA (pouca atividade de 1-50%), Mo (inibição crescimento moderada 50-75%), MA (inibição ativa de crescimento 75- 100%).

No gráfico 1 pode-se analisar uma média de inibição de cada amostra Act2 interação, Act2 isolada e Halo em comparação com o padrão médio de inibição da doxorubicina. Observa-se que a amostra que mais se aproxima da atividade padrão é a Act2 interação. A amostra do halo apresentou menor desvio padrão na porcentagem de inibição para as três linhagens de células tumorais.

Gráfico 1) Análise da porcentagem média de inibição frente as células tumomais

- Análise do potencial de citotoxicidade dos extratos obtidos dos cultivos sólidos das linhagens *Streptomyces* sp. Act1 e *Streptomyces* sp. Act2

Para as amostras provenientes dos cultivos com as linhagens *Streptomyces* sp. Act1 cultivo sólido de *Streptomyces* sp. Act2 cultivo sólido e branco foram realizados experimentos de citotoxicidade frente às células tumorais. Na tabela 20 pode-se observar os resultados do ensaio de citotoxicidade frente às células tumorais HCT-8 (cólon - humano), SF-295 (glioblastoma - humano) e MDA-MB435 (melanoma - humano). Observa-se que a amostra Act2- sólido arroz apresenta melhor atividade citotóxica frente às três linhagens de células tumorais quando comparada com Act1 - sólido arroz. O branco não apresentou atividade, como esperado, indicando que as atividades das amostras são devidas às substâncias produzidas pelas actinobactérias.

Tabela 20. Resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade

Amostras/Tipos de Células	HCT-8	SF-295	MDAMB-435
Branco – Sólido -Arroz	PA (9,74 %)	PA (7,69 %)	SA
Act1 –Sólido -Arroz	MA (78,13 %)	MA (75,85 %)	Mo (51,57 %)
Act2- Sólido - Arroz	MA (92,62 %)	MA (86,38 %)	MA (80,22 %)
Doxorrubicina	MA (96,94%)	MA (87,67%)	MA (97,30%)

Legenda: SA (sem atividade), PA (inibição parcial de 1-50%), Mo (inibição crescimento moderada 50-75%), MA (inibição ativa de crescimento 75- 100%).

No gráfico 3 pode-se observar a porcentagem média de inibição frente às linhagens de células tumorais. A amostra que mais se aproxima do padrão doxorrubicina é a amostra Act2 arroz. A amostra Act1 arroz mostrou menor porcentagem média de inibição e maior desvio padrão devido à atividade moderada apresentada frente às células MDAMB-43.

Gráfico 3) Análise da porcentagem média de inibição frente as células tumomais.

- **Análises do potencial de citotoxicidade dos extratos obtidos dos cultivos realizados com as linhagens *Streptomyces* sp. Act1 e *Streptomyces* sp. Act2 com água do mar**

Amostras Act1 cultivo sólido mar, Act2 cultivo sólido mar bem como as frações obtidas das partições do cultivo líquido Act2 mar e brancos foram submetidos à ensaio de citotoxicidade frente às células tumorais. Na tabela 21 pode-se observar os resultados do ensaio de citotoxicidade frente às células tumorais HCT-8 (côlon - humano), SF-295 (glioblastoma - humano) e MDA-MB435 (melanoma - humano).

Tabela 21. Resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade.

Amostras	Linhagens Celulares		
	HCT-8	MDAMB-435	SF-295
Act2 sol. mar	Mo (62,90%)	Mo (62,14%)	PA (37,91%)
Act1 sol. mar	Mo (73,11%)	Mo (57,75%)	Mo (68,26%)
Sol.branco mar	S.A	S.A	PA (13,37%)
Act2 L. mar acetato	MA (82,90%)	MA (75,09%)	MA (78,89%)
Act2 L. mar hexano	MA (84,07%)	Mo (62,55%)	Mo (71,68%)
Act2 L. mar butanol	Mo (68,40%)	Mo (68,91%)	Mo (59,58%)
Branco L. mar acetato	PA (13,37%)	S.A	PA (29,22%)
Branco L. mar butanol	PA (10,30%)	S.A	PA (7,60%)
Doxorrubicina	MA (96,94%)	MA (87,67%)	MA (97,30%)

Legenda: SA (sem atividade), PA (inibição parcial de 1-50%), Mo (inibição crescimento moderada 50-75%), MA (inibição ativa de crescimento 75- 100%).

Analisando-se os dados da tabela pode-se observar que as amostras Act2 L. mar acetato, Act2 L. mar hexano apresentam elevado potencial citotóxico em pelo menos uma das linhagens tumorais utilizadas. Já as amostras Act2-sol. mar, Act2 L.mar butanol e Act1 sol. mar exerceram moderada atividade citotóxica em pelo menos uma das linhagens tumorais utilizadas.

No gráfico 4 pode-se comparar a atividade média de inibição das amostras em comparação com o padrão doxorrubicina. Observa-se que a amostra que mais se aproxima do padrão é a Act2 L. mar acetato. Além disso, esta amostra apresenta menor desvio padrão para as três linhagens de células utilizadas.

Gráfico 4) Análise da porcentagem média de inibição frente as células tumomais.

CONCLUSÕES

5) Conclusões

O experimento de antagonismo, com formação de halo de inibição foi eficiente para avaliar a capacidade de inibição do crescimento do fungo patogênico *Aspergillus niger* quando este entra em contato com as duas linhagens de actinobactérias *Streptomyces* sp. isoladas do caranguejo *Ucides cordatus*. A linhagem mais promissora para o experimento do halo de inibição foi a linhagem *Streptomyces* sp. Act2. Provavelmente a inibição do crescimento do fungo é provocada pela presença de compostos difusíveis no meio de cultura produzidos por *Streptomyces* sp. uma vez que não há contato dos micélios aéreos das linhagens de *Streptomyces* e das hifas do fungo. O experimento foi reprodutível em larga escala, porém a característica polar dos compostos produzidos dificultou as análises cromatográficas.

A melhor estratégia para avaliar os tipos de metabólitos produzidos foi trabalhar com as frações que eram passíveis de sofrer partição com solvente orgânico acetato de etila. A estratégia de utilização de resina Sephadex LH-20 foi a mais eficiente devido à grande polaridade das amostras encontradas.

Foi possível verificar a presença de açúcares difusíveis no halo de inibição diferente dos constituintes do meio de cultura ISP-2 (maltose e glicose). O fator limitante para purificação e determinação estrutural dos açúcares presentes no halo de inibição foi à dificuldade de detecção por UV, uma vez que esses açúcares não apresentam grupos cromóforos ligados à estrutura. Alternativamente, tentou-se obter uma condição de separação por HPLC usando detector de índice de refração (RID), sem sucesso. A dificuldade de detecção por RID está relacionada à sensibilidade do método analítico uma vez que é capaz de detectar compostos apenas em mais alta concentração na amostra. Além disso, com o RID é necessário usar fase móvel isocrática, o que não possibilitou resolução na separação dos compostos. Uma estratégia para estudos desses açúcares seria realizar reações de derivatização com grupos cromóforos conhecidos na estrutura, possibilitando a detecção por UV. Outras técnicas alternativas para análises seriam a utilização de outros tipos de detectores, porém, não disponíveis no laboratório como o detector evaporativo de dispersão de luz (ESLD- *light scattering detector*) ou detector carregado (CAD – *charged aerosol*

detector), sendo essas técnicas mais amplas para análises capazes de detectar compostos não voláteis e que não apresentam grupos cromóforos.

O potencial citotóxico dos extratos obtidos no experimento de halo de inibição foi efetivo para *Streptomyces* sp. Act2 interação, *Streptomyces* sp. Act2 isolada e halo de inibição sendo que levando a amostra que mais se aproximou da porcentagem média de inibição do padrão doxorrubicina foi a *Streptomyces* sp. Act2 interação. A *Streptomyces* sp. Act2 interação foi mais ativa em comparação à *Streptomyces* sp. Act2 isolada e pode-se, então, relacionar a necessidade da presença do fungo na mesma placa de crescimento para que compostos mais ativos fossem produzidos.

Na literatura pode-se citar um exemplo que envolve a produção de compostos bioativos por actinobactérias que vivem em mutualismo com formigas do gênero *Acromyrmex* (POULSEN, M. et al., 2009) e *Atta* (MUELLER, U.G. et al., 2008). A produção de compostos anti-fúngicos pelas actinobactérias *Pseudonocardias* impede o parasitismo ocasionado pelo fungo *Escovopsis* que ameaça constantemente os ninhos de formigas (MUELLER, U.G. et al., 2008).

Produtos naturais bioativos provenientes de actinobactérias são freqüentemente glicosilados com cadeias de sacarídeos de comprimentos diferentes. A presença de grupos glicosilados nestas estruturas contribui para interações específicas com o alvo biológico (SALAS, et. al, 2007). Pode-se citar como exemplo as antraciclinas glicosiladas isoladas de *Streptomyces* sp. originários de sedimentos marinhos. A komodoquinona A apresenta na estrutura um amino açúcar ligado aos carbonos C3 e C4 sendo nesta forma responsável pela atividade citotóxica de inibição de divisão celular na fase G1 da mitose apresentada por este composto com alvo biológico diferente do estudado para doxorrubicina que seria a intercalação à fita de DNA (OLANO, et. al, 2009).

Para o experimento de cultivo líquido das duas linhagens, *Streptomyces* sp. Act1 e *Streptomyces* sp. Act2, não foi possível obter rendimento razoável para realizar análises cromatográficas preparativas. Porém, pode-se observar que quando comparamos os perfis de RMN de ^1H das amostras *Streptomyces* sp. Act2 cultivo líquido, Act2 interação e Halo que passaram por procedimento de partição com acetato de etila, existe uma semelhança grande nos espectros obtidos. Isto sugere que

compostos similares podem estar sendo produzidos tanto no cultivo em meio líquido ISP-2 e no cultivo em placas de Petri com meio sólido ISP-2.

Já no experimento para avaliação da produção de metabólitos da *Streptomyces* sp. Act2 em placas de Petri, com meio sólido ISP-2, as análises de RMN de ^1H não permitiram observar diferença significativa nos cultivos de sete dias e quinze dias.

Os cultivos realizados em meio sólido de arroz das duas linhagens *Streptomyces* sp. Act1 e *Streptomyces* sp. Act2 foram os mais promissores no quesito rendimento. Para o cultivo sólido *Streptomyces* sp. Act1 trabalhamos com frações e subfrações muito polares com características de açúcares.

As análises realizadas para amostra Sephadex 1-2 pico 1 proveniente do cultivo em meio sólido da linhagem *Streptomyces* sp. Act1 com água destilada resultaram no isolamento de um composto com característica de açúcares pelas análises de RMN de ^1H .

Para linhagem *Streptomyces* sp. Act2 não foi possível isolar nenhum composto de interesse devido a grande dificuldade de trabalho e detecção de compostos em extratos muito polares.

As amostras do cultivo sólido, que foram submetidas aos ensaios de citotoxicidade frente às células tumorais, apresentaram bons resultados. Vale ressaltar que *Streptomyces* sp. Act2 sólido aproxima-se mais da porcentagem média de inibição do padrão doxorrubicina.

Para o cultivo em meio sólido com água do mar observamos que a linhagem *Streptomyces* sp. Act2 é mais resistente às altas concentrações salinas. Observamos variação do crescimento em comparação ao cultivo em meio sólido com água deionizada. Actinobactérias resistentes às altas temperaturas e variações de salinidade, por exemplo, além da capacidade de apresentar simbiose com invertebrados marinhos, são considerados promissores para posteriores estudos uma vez que a eles desenvolveram rotas metabólicas e fisiológicas que os permite não apenas sobreviver às condições extremas, mas também, oferecer um potencial de produção de compostos com atividade antitumoral e farmacologicamente interessantes (OLANO, et al., 2009). *Streptomyces* sp. Act1 mostrou-se menos resistente à variação da concentração salina do meio e o crescimento observado foi menor em comparação ao cultivo sólido

realizado com água do mar. Na água do mar estão principalmente sais clorados que podem ser fontes doadoras de cloro para a maquinaria enzimática das bactérias.

Os cultivos realizados com água do mar foram mais promissores para produção de compostos com grupos cromóforos. A resina XAD-16 foi a melhor estratégia de fracionamento para linhagem *Streptomyces* sp. Act1, cultivada em meio sólido com água do mar. Após posteriores purificações em coluna C18, foram isolados três compostos passíveis de outros estudos para elucidação estrutural.

As estratégias de fracionamento do extrato do cultivo sólido com água do mar de *Streptomyces* sp. Act2 não foram promissoras para isolamento de compostos.

As estratégias de fracionamento para os cultivos líquidos da linhagem *Streptomyces* sp. Act2 realizados com água do mar foram eficazes para a fração butanólica. A partir dos fracionamentos realizados foram obtidas duas subfrações mais interessantes para elucidação estrutural.

Os extratos resultantes dos cultivos realizados com água do mar foram mais ativos nos ensaios de citotoxicidade, sendo que as frações obtidas do cultivo líquido apresentaram maior atividade em comparação com as frações obtidas do cultivo sólido.

Estudos recentes sobre otimização de condições de cultivo para *Streptomyces* sp., provenientes de regiões marinhas e salinas, demonstram que esses microorganismos apresentam melhores crescimentos em condições de temperatura de 30 °C , pH 7,0 e concentrações salinas ótimas de 2% , podendo tolerar até 6% de concentração salina (REDDY, et. al/2011).

De forma geral em todas as condições de cultivo, *Streptomyces* sp. Act2 foi a linhagem mais interessante para produção de extratos com maior atividade citotóxica em células cancerígenas.

A dificuldade de isolamento de compostos das duas linhagens avaliadas está relacionada à característica mais polar e ausência de cromóforos nas substâncias. Isto indica a necessidade de métodos alternativos para separação e detecção deste tipo de metabólito.

REFERÊNCIAS

6) Referências

BENTLEY,S.D.; CHATER, K.F.; CERDEÑO-TÁRRAGA, A.-M.; CHALLIS,G.L.; THOMPSON, N.R.; JAMES, K.D.; HARRIS D.E.; QUAIL, M.A.; KIESER, H.; HARPER,D.; BATEMNA,A.; BROWN,S.; CHANDRA, G.; CHEN, C.W.; CRONIN, A.; FRASER, A.; GOBIE,A.; HIDALGO,J.; HORNSBY, T.; HOWARTH,S.; HUANG,C.-H.; KIESER,T.; LARKE, L.; MURPHY,L.; OLIVER,K.; O'NELL,S.; RABBINOWITSCH,E.; RAJADREAM,M.-A.; RUTHERFORD,K.; RUTTER, S.; SEEGER,K.; SAUNDERS,D.; SHARP,S.; SQUARES, S.; SQUARES, S.; TAYLOR, K.; WARREN,T.; WIETZORREK, A.; WOODWARD,J.; BARREL, B.G.; PARKHILL,J.; HOPWOODD,D.A. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Nature**, v. 417, p.141-147, 2002.

CASTRO, A.C. L; CORREIA, M.M.F; NASCIMENTO, A.R.; JÚNIOR, R.N.P; GAMA, L.R.M; SOUSA,M.M; SENA,A.C.S; SOUZA, R.C.C. Aspectos bioecológicos do caranguejo-uç *Ucides cordatus cordatus*L.1763) (Decapoda, Brachyura) nos manguezais da ilha de São Luis e litoral oriental do estado do Maranhão, Brasil. *Amazônia: Ci. & Desenvolvimento.*, Belém, v. 3, n. 6, jan./jun. 2008.

EUSTÁQUIO, A.S.; POJER,F.; NOEL,J.P.; MOORE,B.S. Discovery and characterization of a marine bacterial SAM-dependent chlorinase. **Nature Chemical Biology**, v. 4, No 1, p. 69-74, 2008.

GALLO M.B; CHAGAS F.O.; ALMEIDA M.O.; MACEDO C.C.; CAVALCANTI B.C.; BARROS F.W.; DE MORAES M.O.; COSTA-LOTUFO L.V.; PESSOA C.; BASTOS J.K.; PUPO M.T. Endophytic fungi found in association with *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae) as resourceful producers of cytotoxic bioactive natural products. **Journal of Basic Microbiology** v. 49, p. 142–151, 2009.

GANESAN, A. The impact of natural products upon modern drug discovery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12 , p. 306-317, 2008.

GLASER, M.; DIELE, K. Asymmetric outcomes: assessing central aspects of the biological, economic and social sustainability of a mangrove crab fishery, *Ucides cordatus* (Ocypodidae), in North Brazil. **Ecological Economics**, v. 49, p. 361-373, 2004.

HUGHES,C.C.; DAVO,A.P.; JENSEN, P.R.; FENICAL,W. The Marinopyrroles, Antibiotics of Unprecedented Structure Class from a Marine *Streptomyces* sp. **Organic Letters**, v. 10, No. 4, p. 629-631, 2008.

HU,S.-C.; HONG,K.; SONG, Y.-C.; LIU,J.-Y. Biotransformation of soybean isoflavones by a marine *Streptomyces* sp. 060524 and cytotoxicity of the products. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 115-121, 2009.

LAM, K.S.; Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, p. 245-251, 2006.

MARCHERLA, V.R.; LIU, J.; BELLOWS, C.; TEISAN, S.; NICHOLSON, B.; LAM, K.S.; POTTS, B.C.M. Glaciapyrroles A, B and C, Pyrrolosesquiterpenes from a *Streptomyces* sp. isolated from Alaskan marine sediment. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 780-783, 2005.

MELO, G. A. S. Manual de Identificação dos Brachyura (caranguejos e siris do Litoral Brasileiro. Editora Plêiade / FAPESP, 604 p., São Paulo, SP, Brasil. 1996.

MUELLER U.G.; DASH D.; RABELING C.; RODRIGUES A. Coevolution between attine ants and actinomycete bacteria: a reevaluation. **Evolution**, v. 62-11, p. 2894-291, 2008

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 461-47, 2007.

NORDHAUS, I. Feeding ecology of the semi-terrestrial crab *U. cordatus* Decapoda: Brachyura) in a mangrove forest in northern Brazil. Tese (Doutorado em Ciências Naturais) - Zentrum für Marine Tropenökologie, Universität Bremen, 217p., 2003.

OH, D.-C.; WILLIAMS, P.G.; KAUFFMAN, C.A.; JENSEN, P.R.; FENICAL, W. Cyanosporasides A and B, Chloro- and Cyano-cyclopenta[a]indene Glycosides from the Marine Actinomycete "*Salinospora pacifica*". **Organic Letters**, v. 8, No. 6, p. 1021-1024, 2006.

OLANO, C.; MÉNDEZ, C.; SALAS, J.A. Antitumor compounds from Marine Actinomycetes. **Marine Drugs**, v. 7, p. 210-248, 2009.

OLMOS, F.; SILVA, R.S. E. Guará: ambiente, flora e fauna dos manguezais de Santos – Cubatão. São Paulo: Empresa das Artes, 2003.

POULSEN, M.; CAFARO, M.J.; ERHARDT, D.P.; LITTLE, A.E.F.; GERARDO, N.M.; TEBBETS, B.; KLEIN, B.S.; CURRIE, C.R. Variation in *Pseudonocardia* antibiotic defence helps govern parasite-induced morbidity in *Acromyrmex* leaf-cutting ants. **Environmental Microbiology Report**, v. 2, p. 534-540, 2010.

PUPO, M.T.; GUIMARÃES, D.O.; FURTADO, N.A.J.C.; BORGES, W.S. Microbial natural products: a promising source of bioactive compounds. In: Carlton A. Taft (Org.), **Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry**, Kerala, India, Research Signpost, p. 51-78, 2006.

REDDY,N.G;RAMAKRISHNA,D.P.N.;GOPAL,S.V.R. A morphological, physiological and biochemical studies of marine *Streptomyces rochei* (MTCC 10109) showing antagonistic activity against selective human pathogenic microorganisms. **Asian Journal of Biological Science**, v 4, p. 1-14, 2011.

RENNER, M.K.; SHEN, Y.-C.; CHENG,X.-C.; JENSES, P.R.; FRANKMOELLE,W.; KAUFFMAN, C.A.; FENICAL,W.; LOBKOVSKY, E.; CLARDY,J. Cyclomarins A-C, New Antiinflammatory Cyclic Peptides Produced by a Marine Bacterium (*Streptomyces* sp.). **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, p. 11273-11276, 1999.

SALAS J.A.; MÉNDEZ C. Engineering the glycosylation of natural products in actinomycetes. **Trends in Microbiology**, v. 15, p. 219-232, 2007.

SIVAKUMAR, K.; SAHU, M. K.; THANGARADJOU,T.; KANNAN, L. Reserch on marine actinobacteria in India. **Indian Journal of Microbiology**, v. 47, p186-196, 2007.

STRIZKE,K.; SCHULZ,S.; LAATSCH,H.; HELMKE,E.; BEIL,W. Novel Caprolactones from a Marine Streptomycete. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 395-401, 2004.

UDWARY, D.W.; ZEIGLER,L.; ASOLKAR, R.N.; SINGAN,V.; LAPIDUS, A.; FENICAL,W.; JENSEN, P.R.; MOORE, B.S. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, No. 25, p. 10376-10381, 2007.

WOO, J.-H.; KITAMURA, E.; MYOUGA,H.; KAMEI,Y. An Antifungal protein foram the Marine Bacterium *Streptomyces* sp. stain AP77 is specific for *Pythium porphyrae*, a causative agente of red rot disease in *Porphyra* ssp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2666-2675, 2002.